



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Medicina Animale Produzione e Salute

---

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE

INDIRIZZO COMUNE

XXVIII° CICLO

**MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELL'APPARATO  
RIPRODUTTORE E DELLA PROGESTERONEMIA  
DURANTE LA GESTAZIONE E LA FASE PREPUBERE  
NEI PICCOLI ANIMALI**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gianfranco Gabai

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giuseppe Radaelli

Supervisore: Dott.ssa Chiara Milani

Dottorando : Marta Cecchetto



## INDICE

<b>ABSTRACT</b>	5 - 6
<b>INTRODUZIONE</b>	9
Ormoni coinvolti nel mantenimento della gravidanza	10
Ipoluteinismo	12
Trattamento dell'ipoluteinismo	14
Le proteine della fase acuta in gravidanza	15
Durata della gravidanza e stima della data di parto	17
Ecografia come mezzo per stimare la data del parto	18
Parametri ecografici fetali ed extra-fetali	19
Influenza della taglia e della razza nella stima ecografica dell'età gestazionale	20
Endocrinologia della riproduzione nella gatta	21
Controllo della riproduzione	23
<i>Progestinici</i>	23
<i>Melatonina</i>	24
<i>Antagonisti del GnRH</i>	25
<i>Agonisti del GnRH</i>	25
<b>MATERIALI E METODI</b>	27
Esperimento 1 (PAPER I)	27
Esperimento 2 (PAPER II)	30
Esperimento 3 (PAPER III)	33
<b>RISULTATI</b>	37
Esperimento 1 (PAPER I)	37
Esperimento 2 (PAPER II)	42
Esperimento 3 (PAPER III)	45
<b>DISCUSSIONE</b>	49
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	65
<b>Paper I</b>	77
<b>Paper II</b>	99
<b>Paper III</b>	121



## ABSTRACT

Il progetto di ricerca si è focalizzato sugli aspetti ecografici ed endocrinologici della fase prepubere e della gravidanza dei piccoli animali.

La prima parte del progetto ha valutato alcuni aspetti endocrinologici della gravidanza in cagne di razza Pastore Tedesco, con anamnesi di interstizi brevi e riassorbimenti embrionali. I dati degli ormoni presi in considerazione (progesterone e prolattina) sono stati confrontati con quelli rilevati in un gruppo di cagne controllo, con cicli e gravidanze normali. Inoltre, proteina C reattiva e ceruloplasmina, proteine della fase acuta positive, sono state dosate in alcuni dei soggetti appartenenti ai due gruppi per valutare l'esistenza di segni indicativi di cause infiammatorie di riassorbimento embrionale. Durante lo studio sono state trattate, durante la gestazione, con progesterone esogeno, perché sospette di insufficienza luteale. Lo scopo è stato quello di confrontare la concentrazione di progesterone, prolattina, proteina C reattiva e ceruloplasmina in questi due gruppi di cagne, per valutare l'effettiva esistenza della necessità di trattare i Pastori Tedeschi con progesterone esogeno e per approfondire la correlazione esistente tra il progesterone e la prolattina, principale fattore luteotropo durante la seconda parte della gravidanza. E' infatti spesso stato riscontrato durante la mia pratica clinica un utilizzo di supplementazione di progesterone esogeno non giustificato da evidenze cliniche, basato solo su un abbassamento della concentrazione della progesteronemia e che porta l'allevatore a richiedere l'utilizzo di supplementazioni ormonali.

Nel secondo lavoro è stato preso in considerazione l'aspetto ecografico della gestazione canina. In particolare il lavoro è stato focalizzato sulla stima della data di parto in cagne di razza Pastore Tedesco utilizzando sia rette di regressione lineare per parametri calcolati da altri autori, sia rette di regressione da noi calcolate specificatamente per il pastore tedesco. La parte 1 del lavoro ha previsto l'applicazione di formule elaborate da altri autori per i parametri ICC (Inner Chorionic Cavity) e BP (Biparietal Diameter) per verificare l'accuratezza della stima della data di parto nei soggetti inclusi nel nostro studio. Nella parte 2 del lavoro sono state elaborate rette di regressione lineare per la stima della data di parto in cagne di razza Pastore Tedesco, per i parametri BD (Body Diameter), CRL (Crown Rump Length) e DPTV (Deep Portion of Telencephalic Vesicle). Nella parte 3 dello studio le formule ottenute nella parte 2 sono state applicate a dati raccolti in cagne gravide di razza Pastore Tedesco con ovulazione non nota.

Il terzo lavoro è stato focalizzato sul controllo della riproduzione. È stato valutato l'effetto dell'impianto di 4.7 mg di Deslorelin nel postporre l'insorgenza della pubertà in gatte prepuberi. Per verificare l'efficacia di questo trattamento sono stati presi in considerazione gli aspetti clinici e comportamentali della fase estrale quali citologia vaginale e la presenza di cellule cheratinizzate, vocalizzazioni e cifosi. Inoltre sono state valutate le variazioni delle concentrazioni di progesterone ed estrogeni, per valutarne le eventuali alterazioni rispetto ai livelli basali riscontrati durante il periodo prepubere. È stato infine valutato l'incremento di peso corporeo nelle gatte incluse nello studio.

## ABSTRACT

The research project was focused on ultrasound aspects and endocrinology of prepubertal period and pregnancy of small animals. The project was developed following three main research studies.

The first study analyzed the endocrinology of pregnancy in German Shepherd bitches with anamnesis of short interestrus interval and embryo resorption. The aim was: a) to study progesterone and prolactin concentrations during pregnancy; b) to evaluate acute phase proteins concentrations (C-reactive protein and ceruloplasmin) in order to evaluate inflammatory signs causing embryo resorption.

Data of progesterone, prolactin, C-reactive protein, and ceruloplasmin concentrations collected in German shepherd bitches and in bitches with normal cycles and pregnancies were compared throughout all the luteal phase.

However, during the study, because of a suspicion of luteal insufficiency, German shepherd bitches were treated with exogenous natural progesterone.

The second study was focused on ultrasonography and fetometry of German Shepherd bitches. The study was divided into three parts: 1) linear regression formula for ICC (Inner Chorionic Cavity) and BP (Biparietal Diameter) in German Shepherders bitches elaborated by other authors were used to verify accuracy of estimation of parturition day in our measurement obtained during pregnancies of (quante?) German Shepherd bitch. In the second part of the work, linear regression formulae to estimate parturition day for BD (Body Diameter), CRL (Crown Rump Length) e DPTV (Deep Portion of Telencephalic Vesicle) were calculated. Data from 15/20 German Shepherd bitches with known ovulation date were used. In the third part of the study, in order to verify the accuracy of linear regression lines in the estimation of parturition date, the formula obtained for BD, CRL and DPTV were used to estimate parturition day in German Shepherd bitches with unknown ovulation date.

The third study was focused on the control of reproduction in order to delay puberty in queens. To this purpose, it was analysed the effect of 4.7mg deslorelin implant in the postponement of puberty in prepubertal queens. Clinical and behavioral signs of heat were monitored. Vaginal cytology with the percentages of keratinized cells, vocalizations and oestrus behaviors were considered. Progesterone and estrogen concentrations were analyzed to find shift from basal levels of prepubertal period, as well as the increase of weight was analyzed to evaluate the influence of the Deslorelin treatment on the body development.





## **INTRODUZIONE**

Nella pratica clinica della medicina della riproduzione dei piccoli animali è sempre più richiesto ai medici veterinari il monitoraggio della funzionalità dell'apparato riproduttore, sia durante le fasi che precedono il ciclo estrale sia durante il ciclo estrale vero e proprio, così come durante la fase luteale o gravidanza.

A seguito della visita clinica generale e specialistica dell'apparato riproduttore, tali monitoraggi sono eseguiti attraverso la valutazione delle concentrazioni sieriche di sostanze ormonali, associate alla vaginoscopia e alla colpocitologia (Concannon, 2011).

La diagnostica per immagini è un ausilio importante per la valutazione dell'apparato riproduttore dei piccoli animali sia durante il monitoraggio di calore sia durante la gestazione. In particolare, l'ecografia è la metodica attraverso la quale, durante il ciclo estrale, è possibile monitorare lo sviluppo follicolare, dei corpi lutei e valutare l'aspetto delle corna uterine e del corpo dell'utero ed eventuali aspetti patologici di queste strutture (Reynaud et al., 2006; Concannon, 2011).

Durante la gestazione, in particolare quella canina, l'esame ecografico è importante per verificare l'instaurata gravidanza e per monitorare lo sviluppo e la vitalità fetali. Inoltre permette di individuare eventuali aspetti patologici delle strutture fetali ed extra-fetali e la presenza di riassorbimenti embrionali, che possono essere indicativi di turbe della produzione di sostanze ormonali coinvolte nel mantenimento della gravidanza (England et al., 2006).

Questo lavoro ha preso in considerazione aspetti ormonali ed ecografici dell'apparato riproduttore dei piccoli animali, focalizzando l'attenzione sulle fasi prepuberi e sulla

gestazione. Gli aspetti presi in considerazione sono stati l'andamento delle sostanze ormonali

- nella specie felina, in particolare in gatte trattate con deslorelin durante la fase prepubere, per verificare la presenza di oscillazioni di progesterone ed estrogeni e di segni di calore nel caso di controllo medico della riproduzione;
- nella specie canina, in particolare in cagne trattate con progesterone esogeno durante la gravidanza. È stata effettuata anche una valutazione clinica ed ecografica dell'apparato riproduttore, per verificare l'andamento della gestazione canina, con l'ulteriore scopo di monitorare lo sviluppo fetale al fine di stimare la data di parto.

#### ORMONI COINVOLTI NEL MANTENIMENTO DELLA GRAVIDANZA

La gravidanza canina ha una durata di  $65 \pm 1$  giorni dal picco di LH (Concannon, 2011). Durante questo periodo, diverse sostanze concorrono al mantenimento della gravidanza e allo sviluppo fetale. Tra queste, quelle più importanti sono il progesterone (P4) e la prolattina (PRL), ma anche LH, estrogeni e relaxina hanno un ruolo nel mantenimento della funzione luteale e nel mantenimento della gestazione (Verstegen-Onclin et al., 2008).

Il progesterone è un ormone prodotto dal corpo luteo, sia durante la fase luteale sia durante la gestazione (Tsutsui, 1983). Durante la gestazione, questo ormone è essenziale per il mantenimento della gravidanza e lo sviluppo fetale (Hoffmann et al., 2004). La concentrazione di progesterone raggiunge valori compresi tra 15 e 80 ng/ml intorno ai 20-35 post-ovulazione (Concannon, 2011; Papa et al., 2011), e successivamente decresce gradualmente fino a raggiungere valori inferiori ai 2 ng/ml quando mancano 1-2 giorni al parto (Concannon, 2011; Verstegen-Onclin et al., 2008).

Durante la fase luteale, la funzionalità del corpo luteo è regolata da diversi fattori, alcuni dei quali agiscono nel primo terzo della gravidanza, come la prostaglandina E (PGE2) che viene prodotta dalle cellule del corpo luteo stesso e hanno un'azione paracrina, stimolando la mitosi delle cellule luteali e la sintesi di enzimi che controllano la steroidogenesi (Janowski et al., 2014). La PGE2 è uno dei fattori luteotropi più importanti nelle fasi luteali gonadotropina indipendenti, durante il primo terzo della vita del corpo luteo (Kowalewski et al., 2012; Kowalewski et al., 2012). Nelle fasi successive della gestazione i più importanti ormoni luteotropi sono prolattina ed LH (Onclin et al., 1997; Onclin et al., 2000). L'LH sembra far parte del complesso luteotropico, ma la sua azione potrebbe essere mediata anche da ormoni specifici della gravidanza, come la relaxina, sui quali esercita un'azione di tipo paracrino (Onclin et al., 2002). La relaxina è l'unico ormone specifico della gravidanza canina, prodotto dalle unità feto placentari e misurabile solo nelle cagne gravide (Root-Kustritz, 2005). Potrebbe essere utilizzato per effettuare la diagnosi di gravidanza, ma solo nelle fasi tardive della gestazione. È invece un buon indicatore della funzionalità placentare, in quanto la relaxina cala rapidamente in seguito alla morte fetale (Johnson, 2008). Durante la gravidanza promuove la secrezione del progesterone agendo direttamente sulle cellule del corpo luteo o indirettamente promuovendo la secrezione di prolattina (Steinetz et al., 1990). La prolattina diventa la sostanza luteotropa più importante nel sostenere l'attività del corpo luteo a partire dalla seconda parte della fase luteale, anche se secondo alcuni autori assume un ruolo rilevante a partire dall'8° giorno post-ovulazione (Concannon et al., 1987). L'ipofisectomia comporta un calo permanente della concentrazione di progesterone a valori inferiori a 2 ng/ml solo dopo il 42° giorno di gestazione (Onclin et al., 1993). La prolattina esplica la propria azione luteotrofica attraverso recettori specifici (PRLr) presenti sulle cellule del corpo luteo. I recettori per

la prolattina sono espressi in elevate quantità fino a metà gestazione, mentre subiscono una down regulation nel pre-parto (Kowalewski et al., 2011).

## IPOLUTEINISMO

Nel momento in cui la produzione di progesterone da parte del corpo luteo è insufficiente, la progesteronemia decresce e la gravidanza, lo sviluppo e vitalità fetali sono compromessi. L'ipoluteinismo comporta riassorbimento embrionale, aborto o parto prematuro, in assenza di segni di infezione, anomalie genetiche dei feti, traumi o disordini metabolici (Root-Kustritz et al., 2001; Görlinger et al., 2005; Uhlmann et al., 2015).

La concentrazione di progesterone sotto la quale la gravidanza è a rischio è ancora oggi argomento di discussione: alcuni autori sostengono che fino a concentrazioni soglia di 2 ng/ml la gravidanza è mantenuta (Görlinger et al., 2005; Johnson, 2008; Becher et al., 2010); altri invece sostengono che la gestazione è compromessa quando la concentrazione di progesterone scende sotto i 5 ng/ml tra la 4° e la 5° settimana di gestazione (Root Kustritz, 2001). Inoltre, il declino della concentrazione di progesterone può essere conseguenza della morte fetale e non esserne la causa (Günzel-Apel et al., 2006). I segni clinici suggestivi di insufficienza luteale sono: anamnesi di riassorbimenti embrionali nelle gravidanze precedenti, short-interestrous interval, perdite vulvari in gravidanza, segni di parto prematuro con natimortalità, segni di sofferenza fetale o segni di riassorbimento fetale rilevati durante i monitoraggi ecografici (Root- Kustritz, 2001; Görlinger et al, 2005; Becher et al, 2010; Rube et al, 2007).

Sembra esistere una predisposizione di razza allo sviluppo dell'insufficienza luteale, e alcune delle razze predisposte a sviluppare ipoluteinismo sono Pastore Tedesco (Günzel-Apel et al., 2005), Bovaro del Bernese (Görlinger et al., 2005; Rube et al., 2007), Rottweiler (Günzel-Apel et al., 2006). Alcuni autori hanno studiato l'andamento

della progesteronemia nei cani di razza Pastore Tedesco, rilevando delle differenze rispetto alla concentrazione di progesterone di altre razze durante la gestazione (Günzel-Apel et al., 2009). La concentrazione di progesterone è risultata significativamente inferiore in cagne di razza Pastore Tedesco rispetto a soggetti di razza Beagle durante le ultime due settimane di gravidanza. Günzel-Apel et al. (2006) hanno confrontato l'andamento della progesteronemia in cagne di razza Pastore Tedesco con un normale periodo interestrile rispetto a cagne della stessa razza con interestro breve, sia durante la fase luteale, sia durante la gravidanza. Gli autori hanno riscontrato una concentrazione di progesterone significativamente più bassa nelle cagne con interestro breve durante la fase luteale. Tale differenza non è emersa nel confronto avvenuto tra i due gruppi durante la gravidanza, probabilmente a causa della supplementazione con progesterone esogeno somministrata ai soggetti con interestro breve per evitare perdite fetali.

Secondo alcuni autori (Becher et al., 2010; Günzel-Apel et al., 2012), sembra esistere una relazione tra la concentrazione di prolattina e quella di progesterone nella patogenesi dell'ipoluteinismo. Günzel-Apel et al. (2009) hanno analizzato la concentrazione di prolattina in cagne di razza Pastore Tedesco, con storia di intervalli interestrili ridotti e normali, che hanno portato ad ipotizzare l'esistenza di una relazione tra la bassa concentrazione di prolattina e la ridotta funzionalità luteale. La concentrazione di prolattina era significativamente più bassa nelle cagne gravide a interestro breve rispetto a cagne gravide con interestro normale. Questo fenomeno può essere conseguenza della supplementazione con progesterone esogeno somministrato nelle cagne con interestro breve per evitare la perdita della gravidanza, ma non si può escludere che la bassa concentrazione di prolattina sia un fenomeno primario, causa anche dell'insufficiente produzione di progesterone da parte del corpo luteo.

Recentemente è stata sviluppata l'ipotesi dell'esistenza di una componente autoimmune che possa causare una diminuzione della concentrazione di progesterone, come avviene nella donna (Roby et al., 2006). Nello studio di Krachudel et al. (2013) sono stati riscontrati anticorpi IgE contro il progesterone nel siero di alcune cagne con storia di interstrio breve e con concentrazioni di prolattina e relaxina normali, suggerendo una possibile connessione tra l'ipoluteinismo e la risposta immunitaria dell'organismo contro il progesterone.

#### TRATTAMENTO DELL'IPOLUTEINISMO

Quando la progesteronemia decresce significativamente tra i 20 e i 35 giorni di gravidanza e iniziano a comparire segni di riassorbimento embrionale che mettono a rischio l'intera gestazione, in assenza di altri segni di patologia, è possibile iniziare a supplementare la fattrice con progesterone esogeno. I principi attivi più frequentemente utilizzati nella pratica clinica sono il progesterone naturale e progestinici (Becher et al., 2010). Le molecole naturali sono metabolizzate velocemente dall'organismo e devono essere somministrate al massimo ogni 72 ore (Görlinger et al., 2005; Buff, 2009), ma hanno pochi effetti collaterali. Frequentemente sono utilizzati dei composti ad uso umano, a 1 mg/kg ogni 48 ore o a 2 mg/kg ogni 72 ore (Becher et al., 2010). Il trattamento deve essere interrotto 2 o 3 giorni prima della data prevista del parto (Buff, 2009, Verstegen et al., 2008). I composti sintetici sono il medrossiprogesterone acetato, il megestrolo acetato e il proligestone. L'Altrenogest (Regumate®, Virbac) è somministrato a dosi di 88 mcg/kg una volta al giorno (Buff, 2009). Nel caso del medrossiprogesterone acetato, la dose è pari a 0.1 mg/kg una volta al giorno, tra il 42° e il 58° giorno di gestazione. I progestinici hanno alcuni effetti collaterali non riscontrati durante la somministrazione di progesterone naturale: aumentano il rischio di distocia al parto a causa della più lenta metabolizzazione e possono inibire la secrezione di

prolattina, riducendo la produzione di latte nel post-parto; inoltre possono causare mascolinizzazione dei feti e aumentano l'incidenza di criptorchidismo (Becher et al., 2010).

Indipendentemente dal composto che è utilizzato, la gravidanza deve essere controllata strettamente durante il trattamento.

#### LE PROTEINE DI FASE ACUTA IN GRAVIDANZA

Le proteine di fase acuta sono dei marker aspecifici di processi infiammatori (Céron et al., 2005; Eckersall, 2000), ma la loro concentrazione può aumentare in modo fisiologico in gravidanza (Ulutas et al., 2009; Céron et al., 2005; Root Kustritz, 2005).

Nel momento in cui si rilevano segni di riassorbimento embrionale o morte fetale, la concentrazione sierica delle proteine della fase acuta può indicare la presenza di stati patologici infiammatori e quindi possono essere un utile strumento per escludere o confermare cause di riassorbimento e aborto di tipo infiammatorio (Evans e Anderton, 1992). Le proteine della fase acuta sono proteine plasmatiche di origine epatica la cui concentrazione varia in risposta ad un danno tissutale (Céron et al., 2005). Esistono proteine di fase acuta negative (albumina e ferritina), la cui concentrazione diminuisce in risposta allo stimolo infiammatorio, e proteine di fase acuta positive (aptoglobina, ceruloplasmina, proteina C reattiva, fibrinogeno, proteina sierica A), la cui concentrazione aumenta quando c'è un danno tissutale. La proteina C reattiva (CRP) è una proteina di fase acuta positiva maggiore, che si innalza in modo molto veloce a seguito di un stimolo infiammatorio. In poco tempo la sua concentrazione tende a tornare a valori basali (Céron et al., 2005). Esistono risultati contrastanti riguardo ai valori della proteina C reattiva in gravidanza: alcuni autori sostengono che si innalza significativamente a partire da 10-15 giorni post-ovulazione fino a raggiungere un picco a 30-45 giorni di gestazione (Kuribayashi et al., 2003). Altri studi riportano invece una

differenza non significativa tra concentrazioni di CRP di cagne gravide e non gravide (Ulutas et al., 2009).

La ceruloplasmina è una proteina di fase acuta positiva moderata, la cui concentrazione cresce con tempi maggiori rispetto la proteina C reattiva e ha un declino più graduale (Céron et al., 2005), registrando una concentrazione significativamente maggiore in cagne gravide rispetto a soggetti non gravidi durante le settimane 2, 4, 5, 6 e 9 della fase luteale (Vannucchi et al., 2002). È coinvolta nell'eritropoiesi e si riscontra a livelli elevati in gravidanza e nel parto (Vannucchi et al., 2002; Ulutas et al., 2009; Gruys et al., 1994). Uno studio riporta un aumento di ceruloplasmina a partire dal 20° giorno post-ovulazione, indicativo dell'instaurarsi della gravidanza (Milani et al., 2006).

L'assetto ormonale durante la gravidanza canina è stato oggetto di molti studi, ma ci sono ancora molti aspetti da approfondire e chiarire. Non sono ancora stati definiti i limiti soglia di concentrazione di progesterone per ogni settimana di gravidanza sotto i quali la gestazione è a rischio, soprattutto nelle razze più predisposte a sviluppare insufficienza luteale, come il Pastore Tedesco. Rimane da chiarire quali siano i criteri precisi secondo i quali sia necessario trattare con supplementazione di progesterone esogeno le cagne gravide sospette di ipoluteinismo. Inoltre sarebbe interessante approfondire le correlazioni esistenti tra gli ormoni luteotropi e la secrezione di progesterone, nonché l'assetto delle proteine della fase acuta in gravidanza, che possono diventare un valido strumento per la valutazione degli stati fisiologici e patologici della gestazione.

## DURATA DELLA GRAVIDANZA E STIMA DELLA DATA DI PARTO

La durata della gestazione è variabile. Se misurata a partire dal giorno dell'accoppiamento, può avere una durata di 56-72 giorni. La sua durata è invece di  $65 \pm 1$  giorni dal picco di LH e di  $63 \pm 1$  giorni dall'ovulazione (Johnston et al., 2001). Poiché diversi fattori possono influenzare la durata della gravidanza, è importante nella pratica clinica poter disporre di mezzi diagnostici che permettano di stimare con una buona accuratezza la data di parto, in modo da poter pianificare un taglio cesareo o consentire una corretta assistenza e incrementare la sopravvivenza neonatale.

La determinazione della data di parto può essere eseguita attraverso diverse tecniche, tra cui il dosaggio della progesteronemia e la radiografia (Luvoni e Beccaglia, 2006; Lopate; 2008). La radiografia permette di apprezzare la presenza e la numerosità dei feti a livello uterino negli stadi avanzati di gravidanza, quando è già avvenuta la mineralizzazione ossea dei feti. Permette di confrontare la dimensione dei feti e quella del canale pelvico, per valutare l'eventuale distocia. A seconda delle strutture fetali visualizzabili nella radiografia, si può stimare l'età gestazionale. Questo metodo rimane poco accurato e poco adeguato per la stima della data di parto, se utilizzato da solo (Lopate, 2008). La progesteronemia può essere un indicatore della stima della data di parto. Sappiamo che l'ovulazione avviene quando la concentrazione di progesterone raggiunge valori compresi tra 4 e 10 ng/ml e che la gravidanza ha una durata di  $63 \pm 1$  giorno dall'ovulazione (Concannon, 2011). La valutazione della concentrazione sierica di progesterone per la stima della data di parto sembra però essere più accurata a fine gravidanza. La concentrazione del progesterone scende drasticamente tra le 12 e le 40 ore prima dell'inizio del parto e a 24-16 ore prima del parto scende a concentrazioni inferiori a 2 ng/ml e raggiunge valori  $< 1$  ng/ml a 12-8 ore prima del parto (Concannon

et al., 1978; Luvoni e Beccaglia; 2006). Alcuni autori hanno valutato la possibilità di predire la data di parto attraverso un singolo dosaggio della concentrazione di progesterone a ridosso del termine della gravidanza, ottenendo una stima poco accurata a causa della variabilità individuale che influenza la concentrazione del progesterone (Rota et al., 2015).

Anche la valutazione della temperatura rettale può essere un ausilio, in quanto scende in modo transitorio di un grado e a volte raggiunge valori  $<37.2^{\circ}\text{C}$  quando il progesterone raggiunge concentrazioni inferiori a 1 ng/ml (Johnston et al., 2001). Questo fenomeno però è molto soggettivo e a volte non è rilevabile anche se la temperatura è valutata 3 volte al giorno. Tale valutazione diventa perciò poco affidabile per predire la data di parto (Johnston et al., 2001).

#### L'ECOGRAFIA COME MEZZO PER STIMARE LA DATA DI PARTO

Molti studi sono stati condotti sull'esame ecografico quale mezzo per determinare l'età gestazionale e predire la data di parto nella specie canina.

Inizialmente alcuni autori hanno stabilito l'età gestazionale basandosi sulla comparsa di strutture fetali ed extra-fetali durante l'esame ecografico (Cartee et al., 1984; Lopate, 2008). Questo metodo diventa scomodo nella pratica clinica, perché implica che i monitoraggi debbano avvenire una volta al giorno.

Più agevole diventa invece elaborare delle correlazioni tra le misurazioni di specifiche strutture fetali ed extra-fetali e l'età gestazionale dei feti (Luvoni e Beccaglia, 2006; Kim et al., 2007; Lopate, 2008).

## PARAMETRI ECOGRAFICI FETALI ED EXTRA-FETALI

Studi iniziali hanno preso in considerazione diversi parametri appartenenti al feto e al sacco gestazionale, quali crown-rump length (CRL), diametro biparietale (BP), diametro del corpo fetale (BD), porzione profonda della vescicola telencefalica (DPTV), diametro della cavità corionica interna (ICC) e il diametro esterno uterino (OUD) (Beccaglia e Luvoni, 2016). Le strutture extra-fetali sono ben visualizzabili fino al 35° giorno di gestazione, mentre le strutture fetali sono più facilmente misurabili durante la seconda parte della gravidanza (Lopate, 2008; Beccaglia et al., 2008).

Nel dettaglio, ICC e OUD sono facilmente visualizzabili e misurabili tra i 45 e i 25 giorni prima del parto. La misura dell'ICC è determinata dalla media di due diametri della porzione decidua del trofoblasto, mentre OUD è il risultato della media di due misurazioni, del diametro uterino esterno a livello del sito di impianto embrionale (Luvoni e Beccaglia, 2006). Per entrambi i parametri i valori sono ottenuti tramite misurazioni a 90° l'una rispetto all'altra.

CRL, BD, BP e DPTV sono invece misurabili nella seconda metà della gestazione, quando mancano meno di 25 giorni al parto. CRL è misurato sul piano sagittale del feto ed è la distanza tra il punto più craniale del capo e il limite caudale del perineo fetale. Questo parametro non può essere misurato fino al parto, in quanto dopo i 45 giorni di gestazione il feto tende a flettersi lateralmente e dorso-ventralmente, rendendo questa misurazione poco realizzabile. La misura del BD è determinata dalla media di due misurazioni, prese l'una a 90° rispetto all'altra, del diametro addominale del feto, su piano trasversale a livello del fegato e della bolla gastrica (England et al., 1990). Il BP è misurato sullo stesso piano del CRL ed è la distanza tra le ossa parietali del cranio fetale. Le ossa del cranio devono essere parallele tra loro, in modo da poter misurare la

corretta distanza tra di esse. Il DPTV rappresenta il talamo e i nuclei basali primordiali e può essere visualizzato in tarda gravidanza, tra i 30 e gli 8 giorni prima del parto (Beccaglia et al. 2008). È misurato sullo stesso piano sagittale del BP ed è visualizzato come un'area anecogena nel cranio fetale.

## INFLUENZA DI TAGLIA E RAZZA NELLA STIMA ECOGRAFICA DELL'ETA' GESTAZIONALE

L'età gestazionale può essere influenzata anche dalla taglia e dal peso della madre, che nella specie canina possono essere molto variabili. In questo senso, alcuni autori hanno elaborato delle rette di regressione lineare per la stima della data di parto in soggetti di taglia piccola e media (Luvoni e Grioni, 2000; Son et al., 2001), dimostrando che BP e ICC sono i parametri aventi una maggiore accuratezza per la stima dell'età gestazionale (Luvoni e Grioni, 2000; Kutzler et al., 2003). Altri autori hanno dimostrato che le stesse formule elaborate per i soggetti di taglia media possono essere applicate con buona accuratezza per stimare l'età gestazionale in soggetti di taglia grande e gigante (Socha et al., 2015; Alonge et al., 2015).

Inoltre sono state elaborate rette di regressione lineare per la stima del giorno del parto in specifiche razze, come Beagle (Yeager et al., 1992), Labrador e Golden Retriever (England et al., 1990).

Uno studio più recente ha focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di rette di regressione lineare per ICC e BP, per stimare la data di parto in cagne di razza Pastore Tedesco, dimostrando un'elevata accuratezza nella stima dell'età gestazionale di queste formule (Groppetti et al., 2015). Questo studio ha inoltre verificato l'accuratezza di tali rette in funzione della numerosità della cucciolata, dimostrando che ICC è più accurato nel

predire la data di parto ( $\pm 1$  o 2 giorni) quando la cucciolata ha più di 9 cuccioli, mentre BP ha maggiore accuratezza quando la cucciolata ha numero di cuccioli compreso tra 4 e 8. Un'altra verifica effettuata da Groppetti et al. (2015) è stata eseguita in funzione dell'età gestazionale, ottenendo che ICC è più accurato nella stima della data di parto ( $\pm 1$  o 2 giorni) quando è misurato tra i 20 e i 46 giorni di gravidanza; BP invece risulta essere un parametro più accurato quando è misurato oltre i 47 giorni di gestazione.

Poche informazioni sono disponibili su altri parametri visualizzabili nella seconda parte della gravidanza, quando è maggiormente richiesta la stima della data di parto. Non sono state elaborate formule per la determinazione della data di parto per CRL, BD e DPTV in cagne di razza Pastore Tedesco.

## ENDOCRINOLOGIA RIPRODUTTIVA NELLA GATTA

Nella gatta, come avviene in tutti i mammiferi, la riproduzione è controllata dall'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio. La gatta raggiunge la pubertà tra i 4 e i 12 mesi di età. Molti sono i fattori che influenzano l'insorgenza della pubertà, tra cui la razza: razze a pelo corto raggiungono la pubertà più precocemente rispetto a quelle a pelo lungo. Anche il periodo in cui il gatto nasce, l'ambiente in cui vive e le condizioni nutrizionali e corporee influenzano l'insorgenza della pubertà. Avendo la gatta un ciclo poliestrale stagionale, nell'emisfero settentrionale la gatta post-pubere manifesta cicli estrali tra febbraio e ottobre. In questo periodo, normalmente i cicli hanno un intervallo di 8-15 giorni. Durante l'intervallo la concentrazione degli estrogeni rimane a livelli basali e non si osserva alcun comportamento sessuale. Al termine dell'intervallo, inizia la secrezione ipofisaria di LH e FSH, che promuove lo sviluppo dei follicoli ovarici e la secrezione di estrogeni da parte degli stessi. Durante il proestro la gatta manifesta tipici comportamenti: diventa più affettuosa, vocalizza e assume un atteggiamento di lordosi

spinale, con la coda spostata di lato. Durante l'estro la gatta accetta l'accoppiamento passivamente. L'estro dura 4-5 giorni, durante i quali i follicoli secernono estrogeni, che rimangono a concentrazioni elevate durante tutto l'estro, per poi scendere in assenza di ovulazione, quando i follicoli regrediscono e diventano atresici. Durante l'estro sembra esistere una correlazione positiva tra le cellule vaginali cheratinizzate e le manifestazioni estrali. La cheratinizzazione delle cellule vaginali è un valido aiuto nell'identificare l'estro nelle gatte che non lo manifestano esplicitamente (Root Kustritz, 2005).

L'ovulazione nella gatta è indotta dal coito. La stimolazione delle pareti vaginali da parte del pene provoca un feedback positivo a livello ipotalamico, per cui si ha un rilascio di GnRH, che induce un aumento di concentrazione di LH, il cui picco viene raggiunto 2-4 ore dopo l'accoppiamento. Più accoppiamenti avvengono, maggiore è il rilascio di LH. L'ovulazione avviene 2-3 giorni dopo lo stimolo esercitato sui follicoli da parte dell'LH (Root Kustritz, 2005). In seguito all'ovulazione, si forma il corpo luteo che segna l'inizio della fase luteinica o della gravidanza, con secrezione di progesterone da parte del corpo luteo. La fase luteale non gravidica ha una durata di circa 24-45 giorni, con una diminuzione del progesterone precoce rispetto alla gravidanza, che ha una durata di circa 65 giorni dall'accoppiamento. Questa differenza potrebbe essere dovuta ad un riconoscimento materno della gravidanza, per cui il corpo luteo gravidico continua a secernere progesterone fino al parto.

Alcuni soggetti però possono avere ovulazione spontanea e ciclare anche in assenza di un accoppiamento. Uno studio riporta l'osservazione di ovulazioni spontanee nell'87% delle gatte incluse nel lavoro, mostrando che l'avvenimento ha un'incidenza maggiore (fino al 57%) quando nell'ambiente viene introdotto un maschio. Questi dati

suggeriscono che la sola presenza di un maschio può favorire l'ovulazione spontanea, in assenza di un accoppiamento (Gudermuth et al., 1997).

## CONTROLLO DELLA RIPRODUZIONE

Nella pratica clinica il controllo della riproduzione nella specie felina è rivolto soprattutto a evitare gravidanze indesiderate e ovulazioni spontanee. Poiché si stanno diffondendo gli allevamenti felini, il controllo dei calori è una richiesta sempre più frequente, che mira ad evitare che le gatte continuino a ciclare quando non c'è ancora interesse nel farle procreare. In questo senso, un approccio chirurgico di ovariectomia, molto diffuso negli anni passati, è sempre meno richiesto nei soggetti di razza, mentre è maggiormente richiesto un metodo di inibizione del ciclo estrale reversibile. Gli allevatori richiedono più spesso di poter posporre l'insorgenza della pubertà e mantenere a livelli basali i valori ormonali che possono favorire l'insorgenza delle manifestazioni estrali. In questa direzione approcci reversibili e non invasivi sono studiati per il controllo della riproduzione. La soppressione reversibile del ciclo estrale e la sua posposizione è ottenuta attraverso l'utilizzo di diverse molecole.

### *PROGESTINICI*

Una recente review di Romagnoli (2015) analizza i dosaggi dei progestinici che possono essere utilizzati nella gatta per il controllo della riproduzione. Il megestrolo acetato può essere utilizzato a basse (0.625 mg/kg/settimana fino a 30 settimane), medie (0.625 mg/kg ogni 24 ore per 1 settimana o ogni 48 ore fino a 2 settimane) o alte dosi (0.625 mg/kg ogni 24 o 48 ore per diverse settimane, o una volta a settimana per mesi o anni). Dosi basse possono essere utilizzate senza effetti collaterali; alte dosi invece possono provocare reazioni avverse. Il medrossiprogesterone acetato utilizzato alla dose

di 0.01 mg/kg ogni 24 ore per 12 mesi può provocare la soppressione dell'estro efficacemente e senza effetti collaterali. Altri progestinici sono stati utilizzati nella gatta. Il levonogestrel è somministrato come impianto (16-36 mg) sottocutaneo a lento rilascio. Nella gatta è stato dimostrato che il suo utilizzo può provocare lo sviluppo di piometra. Il clormadinone acetato può essere somministrato per via orale alla dose di 2.0-12.5 mg o come impianto sottocutaneo (2,5, 5 o 20 mg/kg) per un anno, causando la soppressione dell'estro, associato però ad effetti collaterali. A basse dosi (2.0 mg) somministrate una volta a settimana, si ottiene la sospensione della ciclicità. In ogni caso, l'utilizzo di questa molecola può provocare lo sviluppo di piometra e noduli mammari. Il demadinone acetato è efficace se utilizzato in singola somministrazione orale alla dose di 2.5 mg o 5.0 mg 24 ore dopo l'inizio dell'estro. Il proligestone è utilizzato alla dose di 25-30 mg/kg e può sopprimere l'estro per 8 mesi, senza effetti collaterali importanti. L'altrenogest è somministrato alle dosi 0.044, 0.088 e 0.352 mg/kg per diversi giorni, senza effetti collaterali e consentendo la ripresa dell'attività follicolare in breve tempo dopo la sospensione del trattamento (Romagnoli, 2015).

### *MELATONINA*

Una delle molecole che può essere utilizzata per inibire l'estro nella gatta è la melatonina. La melatonina è un ormone prodotto dall'ipofisi e inibisce il rilascio del GnRH da parte dell'ipotalamo e di conseguenza lo stimolo che questo ha, attraverso LH e FSH, sulle ovaie. La sua concentrazione è elevata durante le ore di buio e segue un ritmo circadiano. L'utilizzo di impianti di melatonina per sopprimere l'estro nel gatto è efficace, ma solo per brevi periodi e non sembra essere efficace nelle gatte prepuberi (Kutzler, 2015).

### *ANTAGONISTI del GnRH*

La loro azione si esplica nel bloccare i recettori del GnRH a livello pituitario, inibendo la secrezione del GnRH e di conseguenza quella di LH ed FSH. L'aciclina fa parte di queste molecole, ma è stata utilizzata nella cagna, per tre giorni a dose di 110 mg/kg, durante il proestro, causando un estro anovulatorio (Gobello et al., 2005). La femmina torna in calore dopo 3 settimane e non sono riportati effetti collaterali.

### *AGONISTI del GnRH*

Questi composti trovano applicazione nella medicina umana con diverse indicazioni, nell'ambito riproduttivo, nell'oncologia e in altri ambiti (Lucas, 2014). Il deslorelin è utilizzato nel cane e nel gatto maschio (uso *off-label*) per sopprimere la funzione endocrina testicolare in modo reversibile attraverso la down regulation dell'attività ipofisaria (Trigg et al., 2001; Göericke-Pesch et al., 2010). Una prolungata esposizione all'azione di questa molecola provoca la desensibilizzazione dei recettori per il GnRH, che risulta in una down regulation e in una diminuzione dei recettori dopo un'iniziale stimolazione (Gobello, 2012). È utilizzato nella cagna per indurre un estro fertile 4-6 giorni dopo l'impianto se somministrato in anestro (Fontaine et al., 2011a). Al contrario, nelle gatte adulte il deslorelin è utilizzato per inibire l'estro (Lucas, 2014). Un impianto di deslorelin di 4.7 mg può inibire l'attività ovarica nelle gatte adulte per una durata compresa tra i 6 e i 37 mesi (Goericke-Pesch et al. 2013; Goericke-Pesch 2011). Il deslorelin ha un effetto reversibile nella gatta (Toydemir et al., 2012), ed è stata riscontrata una normale fertilità e numerosità della cucciolata durante il ciclo successivo al termine dell'effetto del deslorelin (Goericke-Pesch et al., 2013). Lo stesso impianto può posporre l'insorgenza della pubertà in gatte prepuberi (Risso et al. 2012).

In questo studio abbiamo perciò voluto approfondire gli aspetti che riguardano l'efficacia del deslorelin nel posporre l'insorgenza della pubertà in gatte prepuberi, valutando il momento in cui iniziano a manifestarsi i comportamenti estrali e la sua influenza sulle concentrazioni di progesterone ed estrogeni e sulle cellule vaginali, nonché sull'accrescimento corporeo dei soggetti.

## **MATERIALI E METODI**

### **ESPERIMENTO 1 (*PAPER I*)**

Lo scopo dello studio è stato di valutare le concentrazioni sieriche di progesterone, prolattina e proteine della fase acuta (CRP e Ceruloplasmina) durante le diverse settimane di gravidanza in gruppi di cagne pastore tedesco ipofertili trattate con Progesterone e in cagne aventi una fertilità normale.

I soggetti inclusi nello studio sono stati riferiti all'Ospedale Veterinario Universitario Didattico dell'Università di Padova per monitoraggi di calore a scopo riproduttivo o per problemi di ipofertilità e riassorbimenti embrionali.

Sono state incluse nello studio 10 cagne di razza Pastore Tedesco, provenienti da un allevamento il cui proprietario tratta le cagne gravide con progesterone naturale ad uso umano. Questi soggetti hanno età compresa tra 3-7 anni ( $4.6 \pm 1.65$ ) e peso compreso tra 28 e 36 kg ( $32.4 \pm 2.68$ ) e sono state sottoposte regolarmente a controlli sierologici per Herpesvirus, ma non sono mai state sottoposte a indagini tiroidee o a test per la Brucellosi.

Questi 10 soggetti sono stati inclusi secondo i seguenti criteri: a) soggetti pluripari; b) anamnesi di riassorbimenti embrionali e intervalli interestrili inferiori alla norma (<4.5 mesi); c) rapido calo della progesteronemia durante le precedenti gravidanze (vedi Tab.1; Paper I). Questi 10 soggetti costituiscono un gruppo definito "Hypofertile Treated" (HT).

Un secondo gruppo di 12 soggetti, definito gruppo controllo "Non Treated" (NT), è stato monitorato durante la gravidanza.

Questi 12 soggetti provengono da diversi allevamenti e appartengono a razze diverse (2 Collie, 5 Flat Coated Retriever, 4 Boxers, 1 Staffordshire Bull Terrier). L'età è compresa tra 2 e 8 anni ( $4.17 \pm 1.64$ ) e il peso compreso tra 21 e 30 kg ( $28.2 \pm 4.73$ ). I soggetti inclusi nello studio sono stati selezionati secondo i seguenti criteri: a) anamnesi di gravidanze normali e intervalli interestrili normali (>5 mesi); b) assenza di trattamenti durante la gestazione; c) nessuna anomalia fetale rilevata durante i controlli ecografici della gravidanza monitorata durante lo studio (Tab. 2; Paper I).

Tutti i soggetti inclusi nei due gruppi sono stati sottoposti a visita clinica nel periodo estrale, includendo il monitoraggio del calore, attraverso citologia vaginale e raccolta di campioni ematici per il dosaggio di progesterone, per la determinazione del momento dell'ovulazione, che avviene quando il progesterone ha concentrazione compresa tra 4 e 10 ng/ml (Concannon, 2011). Accoppiamenti e inseminazioni artificiali (IA) sono stati pianificati 5-6 giorni dopo il picco di LH, che avviene quando il progesterone raggiunge i 2 ng/ml, due giorni prima dell'ovulazione (Concannon, 2011).

Dopo l'accoppiamento o IA, la raccolta dei campioni ematici è avvenuta una o due volte a settimana durante tutta la gravidanza, in tutti i soggetti inclusi nello studio. La raccolta dei campioni ematici è avvenuta dalla vena cefalica, tra le 8.00 e le 9.00 del mattino. Il sangue è stato posto in provette da siero, centrifugate entro 30 minuti dalla raccolta, per 5 minuti a 2300 rpm.

Sul siero sono stati successivamente dosate le sostanze oggetto di studio. Il progesterone è stato dosato attraverso la metodica di chemiluminescenza (CLIA, Immulite® 1000, Medical System, Siemens, UK), validata nel cane (Kutzler et al., 2003). La prolattina è stata dosata utilizzando la metodica ELISA specifica per la specie canina (Prolactin® Canine Elisa; Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germania), con range di

calibrazione compreso tra 0 e 80 ng/ml e limite di dosaggio di 0.4 ng/ml. Per dosare la proteina C reattiva e la ceruloplasmina, è stata utilizzata una metodica di immunoturbidimetrica (Canine CRP®, Randox Laboratories Limited, County Antrim, Regno Unito; Gesan Production s.r.l., Italia per CRP e ceruloplasmina rispettivamente).

La diagnosi di gravidanza è stata eseguita attraverso indagine ecografica, utilizzando ecografo General Electric Medical System LOGIQ P5/A5 (Soligen, Germany), equipaggiato con sonda convex multi frequenza (6-10 MHz), a partire dal 25° giorno post picco di LH. I soggetti sono stati posti in decubito laterale, previa tricotomia della regione addominale e utilizzo di gel di contatto.

Durante la gravidanza sono stati effettuati monitoraggi ecografici, per evidenziare eventuali riassorbimenti embrionali e per monitorare lo sviluppo e la vitalità fetali (England e Russo, 2006).

I soggetti che costituiscono il gruppo HT sono stati trattati con progesterone esogeno naturale (Prontogest®, Farmaceutici Italia S.r.l.) a 2 mg/kg IM a partire dal 26° giorno post picco di LH, ogni 3 giorni, fino a 5 giorni prima della data presunta di parto.

### Analisi Statistica

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software SAS (Institute Inc., Cary, NC, USA). Per quanto riguarda il progesterone, i valori superiori a 3 volte la deviazione standard rispetto alla media sono stati considerati outliers ed eliminati dall'analisi statistica. Attraverso il test di Shapiro-Wilk è stata valutata la distribuzione dei dati, che è risultata normale. I dati sono stati analizzati utilizzando un test ANOVA per misure ripetute, considerando le settimane di gestazione (1-9 settimane), il trattamento (HT vs NT) e la loro interazione come fattori indipendenti. Le settimane di

gestazione sono state calcolate a partire dal giorno del picco di LH (giorno 0). I dati sono riportati come  $\text{media} \pm \text{errore standard della media (SEM)}$ .

I dati della prolattina non sono normalmente distribuiti e il confronto tra i due gruppi di trattati e controlli (HT vs NT), è stato effettuato utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney. Per effettuare il confronto dei valori di prolattina tra le settimane di gestazione, all'interno dei singoli gruppi, è stato utilizzato il test non parametrico di Kruskal-Wallis. I dati sono stati espressi come mediane e range interquartile.

Per i fattori a coppie tra i livelli dei fattori considerati (settimana e interazione settimana\*trattamento) è stata utilizzata la correzione di Bonferroni sia per i dati distribuiti normalmente, sia per i dati con distribuzione non normale.

La significatività statistica è stata fissata a  $P < 0.05$ .

## ESPERIMENTO 2 (*PAPER II*)

Questo studio è stato suddiviso in tre parti:

- Parte 1: lo scopo è stato quello di verificare l'accuratezza dei dati raccolti per ICC e BP in soggetti gravidi di razza Pastore Tedesco per la stima della data di parto, applicando le rette di regressione lineare elaborate da Groppetti et al. (2015) in soggetti della stessa razza.
- Parte 2: lo scopo è stato quello di elaborare rette di regressione lineare per parametri BD, CRL e DPTV per la stima della data di parto in soggetti gravidi di razza Pastore Tedesco ad ovulazione nota.
- Parte 3: lo scopo è stato quello di verificare l'accuratezza delle rette di regressione lineare elaborate nella parte 2 del lavoro, applicandole a dati raccolti in soggetti gravidi di razza Pastore Tedesco con data di ovulazione non nota.

Sono state incluse nello studio 22 cagne gravide di razza Pastore Tedesco, di età compresa tra i 2 e i 7 anni e peso compreso tra i 28 e i 40 kg. Tutti i soggetti sono stati portati a visita presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico dell'Università di Padova.

Dopo la raccolta dell'anamnesi e una visita generale, i soggetti sono stati sottoposti a una visita specialistica per il monitoraggio del calore, comprensiva di citologia vaginale e prelievo ematico per il dosaggio della concentrazione sierica del progesterone, al fine di individuare il momento dell'ovulazione e pianificare l'accoppiamento. È stato considerato come giorno dell'ovulazione il giorno in cui la concentrazione sierica di progesterone era compresa tra 4 e 10 ng/ml (Concannon, 2011). La concentrazione di progesterone è stata determinata utilizzando la chemiluminescenza (Immulate 1000, Medical System, Genova, Italia), metodica già validata nella specie canina (Kutzler et al., 2003). Tutti i soggetti sono stati accoppiati 48-72 ore dopo l'ovulazione. Per 16/22 soggetti il giorno dell'ovulazione era noto; per i restanti 6/22 soggetti, solo la data dell'accoppiamento è stata presa in considerazione per lo studio.

Su tutti i soggetti sono stati effettuati almeno due monitoraggi ecografici durante la gestazione, utilizzando ecografo General Electric® Medical System LOGIQ P5/A5 (Solingen, Germany) US, equipaggiato con sonda convex multifrequenza (6-10 MHz). I soggetti sono stati posti in decubito laterale, previa tricotomia della regione addominale e utilizzo di gel di contatto.

Gli esami ecografici sono stati effettuati nella prima parte della gestazione, a 21-24 giorni dall'ovulazione o dall'accoppiamento, e nelle settimane successive di gravidanza.

Le cagne erano considerate gravide all'individuazione del sacco gestazionale, visualizzato come una struttura rotondeggiante anecogena, circondata da una parete iperecogena rappresentata dalla parete uterina, con uno strato sottostante iperecogeno, che rappresenta la placenta (England e Russo, 2006).

Durante tutti gli esami ecografici, le misurazioni sono state effettuate su almeno due feti vivi e vitali.

I parametri presi in considerazione nello studio sono: Cavità Corionica Interna (ICC), Diametro del Corpo (BD), Crown Rump Length (CRL), Diametro Biparietale (BD), and Porzione Profonda della Vescicola Telencefalica (DPTV).

I parametri sono stati misurati in accordo con quanto riportato in letteratura (Beccaglia e Luvoni, 2006; Son et al., 2001; Yeager et al., 1992; Lopate, 2008).

## PARTE 1

Per ogni parametro (ICC e BP), i valori ottenuti dalla media delle misurazioni effettuate su due feti sono stati utilizzati in questa prima parte dello studio.

Abbiamo applicato ai nostri dati le rette di regressione lineare per ICC e BP per la stima della data di parto elaborate da Groppetti et al. (2015):

$$DBP = 44.76 - (4.34 * ICC)$$

$$DBP = 38.65 - (12.86 * BP)$$

Abbiamo quindi confrontato i giorni effettivi prima del parto con quelli stimati.

Inoltre sono state effettuate le analisi per verificare l'accuratezza delle misurazioni in base alla numerosità della cucciolata e in base al periodo gestazionale, sia per ICC, sia

per BP, secondo il metodo indicato in Groppetti et al (2015). L'effetto della numerosità della cucciolata è stata analizzato suddividendo le gravidanze in tre classi: classe 1 < 3 cuccioli; classe 2 = 4-8 cuccioli; classe 3 > 9 cuccioli. L'effetto del periodo gestazionale è stato considerato suddividendo la durata della gravidanza in due periodi, diversi per ciascuno dei due parametri: per ICC i due periodi sono <-35 DBP e >-35 DBP; per BP il primo periodo corrisponde a <-15 DBP, il secondo periodo >-15 DBP.

## PARTE 2

Le rette di regressione lineare per la stima della data di parto sono state calcolate per i parametri BD, CRL e DPTV, utilizzando il programma SAS (Institute Inc., Cary, NC, USA); è stato calcolato il coefficiente di determinazione delle rette di regressione lineare ( $R^2$ ).

## PARTE 3

In questa parte dello studio abbiamo voluto verificare l'accuratezza delle rette di regressione lineare da noi elaborate per i parametri BD, CRL e DPTV nello stimare la data di parto.

Abbiamo applicato le rette di regressione lineare elaborate per i parametri BD, CRL e DPTV nello stimare la data di parto su dati raccolti in 5 soggetti gravidi di razza Pastore Tedesco, con ovulazione non nota. Abbiamo quindi confrontato le date effettive di parto con quelle stimate.

## ESPERIMENTO 3 (*PAPER III*)

Lo scopo di questo studio è stato quello di monitorare le fluttuazioni della concentrazione di progesterone e la comparsa di segni clinici di calore in gatte prepuberi

trattate con Deslorelin, e valutare l'efficacia di questa molecola nel postporre l'insorgenza della pubertà e delle variazioni ormonali nelle gatte prepuberi.

Nove gatte prepuberi di razza Europea, di età compresa tra i 3 e i 9 mesi e peso compreso tra 1.4 e 3.5 kg, sono state incluse nello studio. Ogni soggetto proviene da un ambiente diverso, sotto osservazione da parte del proprietario, con libero accesso all'ambiente esterno.

All'inizio dello studio ogni soggetto è stato sottoposto a una visita generale per valutare le condizioni di salute e a una visita specialistica per verificare lo stato prepubere, comprensiva di ispezione dei genitali esterni, citologia vaginale e palpazione delle ghiandole mammarie. È stata raccolta l'anamnesi riproduttiva, sono stati raccolti campioni ematici per l'analisi ematobiochimica e ormonale e campioni di urine tramite cistocentesi. A questo scopo i soggetti sono stati sedati somministrando butorfanolo IM (Dolorex, Intervet) a 0.3 mg/kg, medetomidina IM (Sedator, Eurovet Animal Health) a 10 mcg/kg e ketamina IM (Ketavet, Parke-Davis) a 3 mg/kg.

Un impianto di Deslorelin 4.7 mg (Suprelorin, Virbac) è stato somministrato ad ogni soggetto, posizionando l'impianto tra le scapole. Dopo 7 giorni è stato effettuato un controllo su ogni soggetto, con visita generale e raccolta di anamnesi riproduttiva. A 30 giorni dal posizionamento dell'impianto sono iniziati i controlli periodici, uno ogni mese fino a 18 mesi post-impianto, comprensivi di visita generale e specialistica e raccolta di campioni ematici e di urine in sedazione per il controllo dei parametri ematobiochimici e ormonali (progesterone ed estrogeni). I controlli comprendevano l'ispezione e la palpazione del sito dell'impianto, per verificare l'insorgenza di eventuali effetti collaterali locali.

Le analisi ematobiochimiche sono state eseguite utilizzando Advia 120 (Siemens, Milano, Italia). Le analisi delle urine sono state eseguite con Aution Sticks 10 PA (Arkay, Shiga, Giappone). Le concentrazioni sieriche di estrogeni e progesterone sono state misurate utilizzando la chemiluminescenza (Immulite1000, Medical System, Genova, Italia), con valore minimo misurabile pari a 0.2 ng/ml per il progesterone e 20 pg/ml per gli estrogeni.

Poiché l'insorgenza dei segni di calore doveva essere individuata dai proprietari, è stata data loro una specifica e dettagliata spiegazione dei segni da osservare.

La raccolta dei dati anamnestici è avvenuta telefonicamente ogni mese: i proprietari hanno riportato eventuali osservazioni di atteggiamento di calore delle gatte (continue vocalizzazioni, posizioni di lordosi).

I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando un'analisi della varianza a una via per misure ripetute (ANOVA, GLM, Sigmastat 2.0), considerando il tempo come variabile indipendente e i valori ormonali, la citologia vaginale e il peso come variabili dipendenti.

Il giorno in cui è stato somministrato l'impianto di deslorelin è considerato come il giorno 0.

Il periodo di osservazione successivo al giorno 0 è stato diviso in 5 classi temporali di 60 giorni ciascuna (periodo 1= 1°-60° giorno; periodo 2= 61°-120° giorno; periodo 3= 121°- 180° giorno; periodo 4= 181°-240° giorno; periodo 5= giorni >240°).

Le correlazioni tra i diversi parametri sono state rilevate attraverso indice di correlazione di Pearson.



## RISULTATI

### ESPERIMENTO 1 (*PAPER I*)

Nella tabella n.1 del paper I sono riportati i dati riguardo il segnalamento e l'anamnesi dei soggetti appartenenti al gruppo HT. Nel gruppo HT, 5/10 soggetti (n. 5, 6, 7, 8 e 10) hanno manifestato una diminuzione della concentrazione di progesterone di circa 10 ng/ml tra due misurazioni consecutive, tra la 3° e la 5° settimana di gravidanza.

Nella cagna n. 5 non sono stati riscontrati riassorbimenti embrionali all'esame ecografico, sebbene il progesterone sia passato da 36.1 ng/ml a 19.6 ng/ml ( $\Delta P4= 16.5$  ng/ml) tra i 19 e i 27 giorni dal picco di LH e ha partorito 5 cuccioli vivi a 66 giorni dal picco di LH.

Nel soggetto n.6 sono stati riscontrati riassorbimenti embrionali multipli alla diagnosi di gravidanza mediante esame ecografico, quando il progesterone è sceso da 32.7 ng/ml a 25.4 ng/ml ( $\Delta P4= 7.3$  ng/ml) alla 3° settimana di gestazione; ha partorito 9 cuccioli vivi e vitali a 60 giorni dal picco di LH.

Nella cagna n.7 il calo del progesterone è stato osservato tra i giorni 28 e i giorni 31 dal picco di LH ed è sceso da 27.5 ng/ml a 12 ng/ml ( $\Delta P4= 15.5$  ng/ml). Ha partorito 9 cuccioli vivi e vitali al giorno 63 dal picco di LH. Nel soggetto n.8 il progesterone è diminuito da 19.4 ng/ml a 8.7 ng/ml ( $\Delta P4= 10.7$  ng/ml) tra 11 e 19 giorni dal picco di LH, partorendo a 63 giorni dal picco di LH.

Nella cagna n.10 sono stati osservati riassorbimenti embrionali multipli alla diagnosi di gravidanza al giorno 31 dal picco di LH, quando il progesterone aveva una concentrazione di 5.0 ng/ml. Altri segni di riassorbimento embrionale sono stati rilevati ai successivi controlli ecografici, durante il trattamento con progesterone esogeno.

Questo soggetto è stato sottoposto a intervento di taglio cesareo a 63 giorni dal picco di LH, partorendo 1 cucciolo vivo e vitale.

Le rimanenti 5 cagne (n. 1, 2, 3, 4 e 9) non hanno manifestato alcun calo di progesterone.

Nel soggetto n. 4 non sono stati rilevati segni di riassorbimento embrionale all'esame ecografico e ha partorito 6 cuccioli vivi e vitali a 64 giorni dal picco di LH.

Le cagne n. 1, 2, 3 e 9 hanno partorito ai giorni 64, 66, 64 e 64 dal picco di LH, rispettivamente. Sfortunatamente non è stato possibile effettuare i monitoraggi ecografici su questi soggetti e solo di due soggetti abbiamo avuto la numerosità della cucciolata (n.1= 3 cuccioli vivi e vitali; 4 cuccioli nati morti; n.2= 3 cuccioli vivi e vitali).

Tutti i soggetti appartenenti al gruppo NT hanno condotto gravidanze normali, e hanno partorito  $6.58 \pm 3.4$  cuccioli vivi e vitali al giorno  $65.33 \pm 1.72$  (Mean $\pm$ SD) dal picco di LH.

In due cagne appartenenti al gruppo NT, la n.21 e la n.22, sono stati riscontrati segni di riassorbimento embrionale alla diagnosi di gravidanza ecografica. Nel primo soggetto (n.21), 3 riassorbimenti e 6 embrioni vivi e vitali sono stati osservati all'esame ecografico al 23° giorno dal picco di LH. Successivamente ha partorito 6 cuccioli vivi e vitali tramite taglio cesareo a 65 giorni post picco di LH. Nel soggetto n.22 sono stati rilevati 3 riassorbimenti e 3 embrioni vivi e vitali a 36 giorni dal picco di LH, ed ha partorito 2 cuccioli vivi e vitali a 67 giorni dal picco di LH. Entrambe le cagne non sono state sottoposte a trattamenti ormonali, ma poiché non hanno rispettato uno dei tre criteri di selezione per rientrare nel gruppo NT (nessuna anomalia ecografica durante la gravidanza), sono state rimosse dal gruppo ed escluse dall'analisi statistica e descritti separatamente.

I valori medi delle concentrazioni di progesterone dei gruppi NT e HT durante le 9 settimane di gestazione sono riportati in figura n.1 e tabella n.3 (PAPER I). Due valori appartenenti alla settimana 6, considerate outlier, sono stati esclusi dall'analisi statistica.

I valori di progesterone sono distribuiti normalmente. L'ANOVA non ha rilevato alcuna differenza significativa nelle concentrazioni di progesterone tra il gruppo HT e il gruppo NT, attraverso le 9 settimane di gestazione.

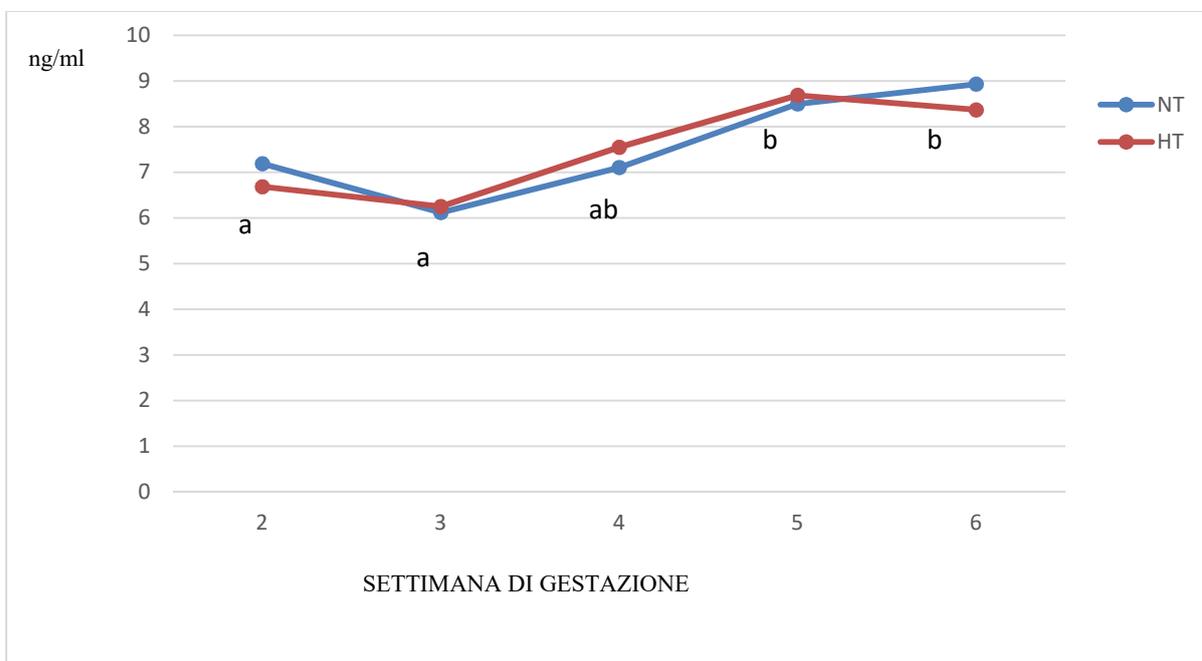
Nel gruppo HT, la concentrazione di progesterone è significativamente più bassa nella settimana 5 rispetto alla settimana 4 di gravidanza, sebbene si sia mantenuto sempre a valori normali (week 4=  $22.05 \pm 1.34$  ng/ml; week 5=  $13.84 \pm 1.34$  ng/ml;  $P < 0.05$ ) (Figura n.1; PAPER I). In 2/10 soggetti del gruppo HT (n.8 e n.10) la concentrazione di progesterone ottenute durante la settimana 5 sono 6.7 e 5.0 ng/ml, rispettivamente. Nelle altre 8 cagne la concentrazione di progesterone durante la 5° settimana di gestazione si è mantenuta a concentrazioni superiori ai 9.0 ng/ml (9.5 – 25.3 ng/ml).

I dati della concentrazione della prolattina non sono normalmente distribuiti. Il test non parametrico di Mann-Whitney ha rivelato una differenza significativa nella concentrazione della prolattina tra il gruppo HT e NT, durante le settimane dalla 2° alla 7° di gestazione ( $P < 0.001$ ; Tabella n.4; PAPER I). All'interno del gruppo HT, una differenza significativa nella concentrazione della prolattina è stata dimostrata attraverso il test non parametrico di Kruskal-Wallis, tra le settimane di gestazione (wks 2-3 < wks 5-7 < wks 8-9) ( $P < 0.05$ ; Table n.4; PAPER I).

I dati riguardanti le concentrazioni di progesterone e prolattina dei due soggetti esclusi dal gruppo NT sono riportati nelle figure n.2 e n.3 del PAPER I. Il valore medio della concentrazione di prolattina è 11.90 ng/ml (range 6.64-17.87 ng/ml) nel soggetto n.21 e 14.20 ng/ml (range 6.74-20.33 ng/ml) nel soggetto n.22. In uno di questi soggetti, la

concentrazione di progesterone è scesa sotto la soglia considerata un rischio per la gravidanza al giorno 43, raggiungendo i 4.5 ng/ml (Figura n.2, PAPER I). Entrambi i soggetti hanno portato a termine la gestazione, con i restanti feti vivi e vitali.

I valori di ceruloplasmina derivano da campioni appartenenti a 5/10 soggetti del gruppo HT e da 10/10 soggetti del gruppo NT. I dati non sono distribuiti normalmente e sono espressi come mediana e range interquantile. L'analisi statistica è stata effettuata su un totale di 93 campioni, 49 appartenenti al gruppo NT e 44 appartenenti al gruppo HT. Il test non parametrico di Mann-Whitney non ha rilevato alcuna differenza significativa tra le concentrazioni di ceruloplasmina tra i gruppi HT e NT (Figura n.1). All'interno dei due gruppi esiste un effetto settimana e il test non parametrico di Kruskal-Wallis ha evidenziato l'esistenza di una differenza significativa tra le concentrazioni di ceruloplasmina tra le settimane di gestazione (wks 2-3 < wks 5-6).



**Figura 1.** Andamento delle concentrazioni di ceruloplasmina nei gruppi NT ed HT. a diverso da b ( $P < 0.001$ ).

I valori delle concentrazioni di proteina C reattiva dei due gruppi sono riportati in Tabella n.1. L'analisi statistica è stata effettuata su 45 campioni, 25 appartenenti a 3/10 soggetti del gruppo NT e 19 appartenenti a 3/10 soggetti del gruppo HT, rispettivamente. I dati non sono distribuiti normalmente e sono espressi come mediana e range interquartile. Il test non parametrico di Mann-Whitney non ha riscontrato differenze significative tra il gruppo HT e il gruppo NT durante le settimane di gestazione dalla 3 alla 9. Una differenza significativa è emersa tra i due gruppi durante la settimana 2 di gestazione ( $P < 0.001$ ).

SETTIMANE	HT(mg/dl)		NT(mg/dl)	
	Mediana	Interquartile range	Mediana	Interquartile range
2*(n=6)	ND	ND	4.48	0-8.96
3(n=4)	0	0-0	0	0-0
4(n=8)	0.38	0.13-1.79	0.25	0.032-0.49
5(n=5)	1.44	0-1.55	0.94	0.61-1.27
6(n=6)	1.1	0.6-1.22	1.16	0.29-1.20
7(n=6)	0.35	0-0.44	0	0-0.69
8(n=4)	0.33	0-0.65	0.26	0.08-0.43
9(n=6)	0	0-4.35	0	0-0.27

**Tabella 1.** Valori di concentrazione di proteina C reattiva nei gruppi HT e NT. I valori sono riportati come mediana e interquartile range. n è il numero di campioni su cui è stata effettuata l'analisi statistica. ND= non determinato.

\* Individua la differenza significativa tra le concentrazioni di proteina C reattiva tra i due gruppi ( $P < 0.001$ ).

## ESPERIMENTO 2 (*PAPER II*)

Un soggetto è stato escluso dall'analisi statistica perché la gravidanza di durata anormale non rientrava nei criteri di selezione; un altro soggetto è stato escluso perché i dati del giorno effettivo di parto e della numerosità della cucciolata erano mancanti.

Sono stati eseguiti un totale di 76 esami ecografici, durante i quali sono state raccolte un totale di 369 misurazioni (ICC n=70; BD n=101; CRL n=55; BP n=86; DPTV n=57). L'ICC è stato misurato fino al giorno -23 dal parto; il CRL è stato misurato tra -38 e -19 giorni dalla data di parto; le misure di BD e di BP sono state registrate tra -33 e -9 giorni e tra -31 e -2 giorni dal parto, rispettivamente; il DPTV è stato rilevato tra i -27 e -9 giorni dal termine della gravidanza.

I cuccioli partoriti dai soggetti inclusi nell'analisi statistica (20 soggetti) sono stati in totale 122; il range di numerosità della cucciolata variava tra 1-10.

### PARTE 1

La Tabella n.1 mostra i dati relativi a ICC. La differenza tra DBP stimato e quello effettivo ha un range di 0.04-5.58 giorni.

La Figura n.1 la Tabella n.1 del Paper II rappresentano il risultato dell'applicazione della retta di regressione lineare per la stima della data di parto elaborata da Groppetti et al. (2015) ai nostri dati di ICC. L'analisi è stata condotta su 30 misurazioni, raccolte su 18/20 soggetti inclusi nello studio, tra i -43 e i -23 giorni dalla data di parto. Dall'analisi è stato eliminato un soggetto perché aveva un solo feto alla diagnosi di gravidanza. La tabella n.2 del Paper II descrive i risultati derivati dall'analisi dell'accuratezza di ICC nel predire la data di parto in funzione della numerosità della cucciolata ( $\leq 3$  cuccioli; 4-8 cuccioli;  $\geq 9$  cuccioli); l'accuratezza della stima della data di parto utilizzando ICC

in funzione della classe temporale ( $\leq 35$  o  $> 35$  giorni dalla data di parto) è descritta in Tabella n.3. In entrambi i casi l'errore considerato accettabile è di  $\pm 1$  o  $2$  giorni. L'accuratezza nella stima della data di parto è maggiore quando ICC è misurato nel periodo  $< -35$  giorni dalla data di parto, in cucciolate con più di 9 cuccioli.

I dati relativi a BP sono riportati in Tabella n.4. La differenza tra il DBP effettivo e quello stimato ha un range compreso tra 0.03 e 6,81 gironi. L'applicazione della retta di regressione lineare elaborata da Groppetti et al. (2015) sui nostri dati di BP è rappresentata nella Figura n.2 del Paper II. L'analisi è stata condotta su 40 misurazioni, raccolte su 17/20 soggetti, tra i -31 e i -2 giorni dalla data di parto. Dall'analisi è stato eliminato un soggetto perché aveva un solo feto alla diagnosi di gravidanza. Le tabelle n.5 e n.6 mostrano l'accuratezza dei nostri dati di BP nel predire la data di parto in funzione della numerosità della cucciolata ( $\leq 3$  cuccioli; 4-8 cuccioli;  $\geq 9$  cuccioli) e della classe temporale ( $< 15$  giorni o  $> 15$  giorni dalla data di parto), rispettivamente. L'errore considerato accettabile nella stima della data di parto è di  $\pm 1$  o  $2$  giorni.

BP è risultato essere più accurato nel predire la data di parto se misurato in cucciolate con numero di cuccioli compreso tra 4 e 8, quando mancano più di 15 giorni alla giorno del parto.

## PARTE 2

In questa seconda parte del lavoro sono state elaborate le rette di regressione lineare per la stima del giorno del parto in cagne di razza Pastore Tedesco per i parametri CRL, BD e DPTV (Tabella n.7; Figure n.3, n.4 e n.5; Paper II).

Le rette risultanti sono le seguenti:

- $DBP = -34.92 + (5.41 * BD)$  ( $R^2 = 0.95$ ;  $P < 0.001$ )
- $DBP = -35.41 + (2.10 * CRL)$  ( $R^2 = 0.85$ ;  $P < 0.001$ )
- $DBP = -33.56 + (28.38 * DPTV)$  ( $R^2 = 0.61$ ;  $P < 0.001$ )

Per l'elaborazione di queste rette di regressione lineare sono state utilizzate 44 misurazioni ottenute da 13/20 soggetti per il BD, 23 misurazioni di 13/20 soggetti per il CRL e 27 misurazioni prese su 14/20 soggetti per il DPTV, rispettivamente. Di tutti i soggetti è nota la data dell'ovulazione.

Il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) delle rette di regressione di questi parametri è 0.95, 0.85 e 0.61 per BD, CRL e DPTV rispettivamente, con un errore accettabile di  $\pm 1$  o  $\pm 2$  giorni.

### PARTE 3

L'accuratezza delle rette di regressione lineare per la stima della data di parto in cagne di razza Pastore Tedesco, elaborate nella parte 2 del lavoro, è stata valutata su soggetti della stessa razza con ovulazione non nota. I risultati di questa analisi sono riportati in tabella n.8 del Paper II. L'errore considerato accettabile è di  $\pm 1$  o 2 giorni. Le rette sono state testate su 5/20 soggetti, per un totale di 7, 5 e 5 misurazioni per BD, CRL e DPTV, rispettivamente. Il BD è risultato essere il parametro più accurato nel predire la data di parto (100% con un errore di  $\pm 2$  giorni).

### ESPERIMENTO 3 (*PAPER III*)

Tutti i soggetti sono risultati essere in buone condizioni generali prima dell'inizio dello studio.

I risultati degli esami ematobiochimici e delle urine sono disponibili per 8/9 soggetti (Tabella n.2 e n.3; Paper III) e risultano nei limiti della normalità. I soggetti si sono mantenuti in salute per tutta la durata dello studio, fatta eccezione per il soggetto n.4, deceduto in seguito a infezione con virus della leucemia felina a 27 mesi di età (18 mesi dopo la somministrazione dell'impianto di Deslorelin), senza aver manifestato alcun segno di calore. Le gatte n.2 e n.3 sono scomparse al 7° mese di studio (entrambe all'età di 15 mesi), senza aver manifestato alcun segno di pubertà; il soggetto n.5 è deceduto a 19 mesi di età a seguito di un trauma, ma non ha mai mostrato segni di calore. La gatta n.8 è stata sottoposta ad intervento chirurgico di ovariectomia, per richiesta del proprietario, all'età di 24 mesi, senza aver mai manifestato segni di pubertà. Nei restanti 4 soggetti, i proprietari hanno riferito la comparsa di segni compatibili con il raggiungimento della pubertà tra i 21 e i 36 mesi di età.

Nel soggetto n.2 segni di calore (vocalizzazioni, rolling e inarcamento della schiena) sono comparsi 7 giorni dopo il trattamento con Deslorelin e sono durati per almeno 8 giorni. La citologia vaginale in questo soggetto ha mostrato 100% di cellule cheratinizzate a 7 giorni dalla somministrazione del farmaco.

Nessun altro segno di inizio della pubertà è stato manifestato negli altri soggetti inclusi nello studio.

Le citologie vaginali post-trattamento mostrano un grado di cheratinizzazione significativamente più elevato durante i primi due mesi rispetto al restante periodo dello

studio (Tabella n.4; Paper III). La percentuale di cellule vaginali cheratinizzate è <5% in 5 gatte e fluttua tra 0 e 25% nei restanti 4 soggetti per tutta la durata dello studio.

L'analisi statistica ha dimostrato che la percentuale di cellule cheratinizzate nel periodo 1 dello studio (giorni 1-60 post trattamento) è significativamente più alta dei periodi 2 e 3 ( $P < 0.05$ ) e del periodo 4 ( $P < 0.01$ ). L'indice di correlazione di Pearson ha mostrato una correlazione negativa tra i giorni post trattamento e la % di cellule vaginali cheratinizzate.

Durante lo studio, le concentrazioni ormonali sono rimaste a livelli basali (Tabella n.4; Paper III). I valori delle concentrazioni di estrogeni sono rimasti per lo più a livelli basali, <20 pg/ml. I casi in cui i valori di estrogeni sono superiori a 20 pg/ml non sono mai associati ad altri segni di calore o cheratinizzazione delle cellule vaginali.

La progesteronemia ha subito fluttuazioni tra 0.2 e 1.2 ng/ml. Su 64 campioni, la maggior parte ha mostrato concentrazioni di progesterone comprese tra 0.2 e 0.99 ng/ml; solo in 4/64 campioni la progesteronemia ha raggiunto valori compresi tra 1.0 e 1.2 ng/ml.

Anche il peso corporeo dei soggetti ha subito un incremento durante lo studio (periodo 0 < periodo 2 < periodo 5), con un indice di correlazione di Pearson positivo (0.542) tra il peso corporeo e il tempo (Tabella n.4; Paper III). In un solo soggetto (n.4) il peso, dopo un iniziale aumento, è iniziato a diminuire 244 giorni post trattamento, ma probabilmente tale fenomeno è dovuto a infezione da parte del virus della leucemia felina, che ha portato il soggetto a morte 499 giorni post trattamento.

In 4/9 soggetti inclusi nello studio monitorati per un lungo periodo post trattamento, segni di raggiunta pubertà non sono stati riscontrati fino all'età di 36 (gatta n.1), 24

(gatta n.6), 25 (gatta n.7) e 21 mesi (gatta n.9) (Tabella n.1; Paper III). Il soggetto n.8 è stato sottoposto a intervento chirurgico di ovariectomia a 24 mesi di età, ancora prepubere.

Nessun effetto collaterale locale, nel sito di iniezione dell'impianto, è stato osservato nei 9 soggetti.



## DISCUSSIONE

Nell'esperimento 1 abbiamo valutato l'andamento della concentrazione sierica di progesterone, di prolattina, di proteina C reattiva e di ceruloplasmina in cagne gravide di razza Pastore Tedesco (gruppo HT) con anamnesi di ipofertilità, interstri brevi (<4 mesi) e riassorbimenti embrionali, trattate dall'allevatore con progesterone naturale esogeno. I dati raccolti sono stati confrontati con quelli raccolti in gruppo di controllo (gruppo NT), con calori e gravidanze normali.

Dalle analisi eseguite è emerso che 5 soggetti del gruppo HT (n. 1, 2, 3, 4 e 9) non hanno avuto alcun calo drastico del progesterone. In un soggetto appartenente a questo gruppo (n. 10), la concentrazione di progesterone è scesa sotto i 5 ng/ml a 31 giorni dal picco di LH, e contemporaneamente è stata riscontrata la presenza di riassorbimenti embrionali tramite l'esame ecografico. Le cagne rimanenti (n. 5, 6, 7, 8) del gruppo HT hanno manifestato un calo di progesterone di circa 10 ng/ml tra una misurazione e quella successiva, accompagnato in alcuni soggetti da segni di riassorbimento embrionale.

Soprattutto nelle cagne n.8 e n.10, in cui, intorno ai 31 giorni dal picco di LH, la discesa della concentrazione di progesterone a concentrazioni vicine alla soglia considerata accettabile per il mantenimento della gravidanza (Root-Kustritz, 2001)(6.7 ng/ml e 5.0 ng/ml, rispettivamente) si associa a segni ecografici di riassorbimento embrionale, può esistere l'indicazione per effettuare il trattamento esogeno con il progesterone.

I valori medi di progesteronemia nel gruppo HT non differiscono statisticamente da quelli appartenenti al gruppo NT, per tutta la durata della gravidanza. L'utilizzo di progesterone naturale nel gruppo HT rende impossibile distinguere la secrezione

endogena del progesterone dal supplemento esogeno a partire dalla 4° settimana di gravidanza fino al parto, in quanto la metodica di dosaggio non permette di differenziare le due molecole.

Nel gruppo HT, nonostante l'inizio del trattamento a partire dal 26° giorno dal picco di LH, la concentrazione di progesterone scende di 10 ng/ml tra la settimana 4 e 5 (Tabella n.3, Paper I). Questa diminuzione di progesterone potrebbe essere giustificata pensando che durante la seconda parte delle gestazione aumentano il volume ematico circolante, la clearance epatica e il metabolismo placentare, che può portare a una diminuzione della concentrazione di progesterone (Concannon et al., 2001).

Un'altra possibile spiegazione è che la supplementazione di 2 mg/kg di progesterone ogni due giorni fosse insufficiente, ma al momento questa ipotesi non è stata approfondita.

Un brusco calo del progesterone è stato riscontrato anche in uno dei soggetti appartenenti al gruppo NT (n.16), nel quale il progesterone scende di 11.9 ng/ml tra i giorni 9 e 15 post picco di LH. Nello stesso soggetto, un altro calo di 13.2 ng/ml è stato registrato tra i 23 e i 29 giorni post picco di LH.

Come nella donna, anche nella cagna la riduzione drastica di progesterone potrebbe essere dovuta a un'apatologia autoimmune che causa lo sviluppo di anticorpi contro il progesterone (Uhlmann et al., 2015), che possono interferire con l'azione del progesterone esogeno e anche con il dosaggio del progesterone. Sarebbe interessante approfondire questo aspetto, ricercando gli anticorpi contro il progesterone nei campioni di siero appartenenti ai soggetti del gruppo HT, per verificare la presenza o meno di un ruolo del sistema immunitario nel calo della progesteronemia.

Un intervallo interestrade breve può portare a un accorciamento della fase luteale e le cagne presentate con questa anamnesi possono diventare delle candidate ad essere trattate con progesterone esogeno durante la gravidanza (Günzel-Apel et al., 2006). Il trattamento è consigliato anche quando la concentrazione sierica di progesterone scende sotto la soglia considerata accettabile per il mantenimento della gravidanza o quando scende di 10 ng/ml tra due dosaggi consecutivi (Krachudel et al., 2013), a cui si associano riassorbimento embrionale all'esame ecografico, perdite vaginali, aborto imminente (Günzel-Apel et al., 2009). Infatti, sebbene la soglia di progesterone sotto la quale la gravidanza è considerata a rischio attualmente è 2 ng/ml, alcuni autori descrivono casi in cui il riassorbimento embrionale è stato riscontrato in cagne con progesterone >2 ng/ml, in assenza di altri segni o sintomi di altre patologie (Görlinger et al., 2005; Rube et al., 2007). Questi studi però includono pochi soggetti e il loro obiettivo non è quello di identificare la soglia di progesterone indicata come appropriata per iniziare la supplementazione di progesterone.

L'identificazione di una soglia di progesterone nelle cagne con sospetta insufficienza luteale è complicata dal fatto che la supplementazione di progesterone inficia la diagnosi di ipoluteinismo, in quanto, se si utilizzano molecole naturali per la supplementazione, queste non vengono discriminate dal progesterone endogeno; se utilizziamo molecole sintetiche, sebbene distinguibili dal progesterone endogeno, possiamo impedire riassorbimenti o aborti, ma allo stesso tempo non riusciamo ad identificare la soglia di progesteronemia sotto la quale si verificano tali eventi (Günzel-Apel et al., 2006; Günzel-Apel et al., 2009; Günzel-Apel et al., 2012; Tibold et al., 2009; Krachudel et al., 2013).

L'ideale sarebbe stabilire una soglia settimanale di progesterone sotto la quale esiste un rischio di perdere la gravidanza. In questo modo il clinico sarebbe facilitato nel gestire cagne con sospetto ipoluteinismo (Sontas et al., 2012).

La concentrazione di prolattina risulta significativamente più bassa nei soggetti con sospetta patologia di ipoluteinismo rispetto ai soggetti non trattati dalla seconda alla settima settimana di gravidanza. All'interno del gruppo trattato esiste una differenza significativa nella concentrazione di prolattina tra le settimane di gestazione (wks 2-3 < wks 5-7 < wks 8-9; Tabella n.4; Paper I). È interessante la differenza riscontrata prima e dopo il trattamento nei soggetti appartenenti al gruppo trattato, in quanto il progesterone, endogeno ed esogeno, può inibire la secrezione di prolattina (Günzel-Apel et al., 2006), ma nel nostro studio i valori di prolattina aumentano significativamente fino al parto. Günzel-Apel et al. (2006) hanno dimostrato che nei Pastori Tedeschi con intervalli interestruali brevi e con sospetta insufficienza luteale la secrezione di prolattina è inferiore rispetto alla norma. Poiché la prolattina è uno dei principali fattori luteotropi, una bassa concentrazione di questo ormone può causare una riduzione prematura del progesterone.

Non è ancora chiaro come mai nei soggetti trattati la concentrazione di prolattina continui a crescere nonostante la somministrazione farmacologica, fino a raggiungere concentrazioni non significativamente diverse rispetto al gruppo non trattato nelle settimane 8-9 di gravidanza.

Non è di nostra conoscenza uno studio che abbia riportato l'aumento della concentrazione di prolattina durante la gravidanza in cagne con sospetto ipoluteinismo: la ragione di questo aumento e il suo significato andranno approfonditi in futuro.

Onclin and Verstegen (1997) riportano un aumento della concentrazione di prolattina intorno al 25° giorno di gestazione, raggiungendo un picco al parto. È interessante notare che nelle due cagne appartenenti al gruppo non trattato, escluse dall'analisi statistica a causa del riscontro di riassorbimenti embrionali durante la diagnosi ecografica di gravidanza, la concentrazione di prolattina ha valori sovrapponibili a quelli dei soggetti del gruppo trattato. La concentrazione di progesterone in uno di questi soggetti è scesa a 4.5 ng/ml a 43 giorni dal picco di LH, ma ha comunque portato a termine la gestazione senza aver ricevuto alcuna supplementazione di progesterone. Saranno necessari ulteriori approfondimenti in cagne non trattate nonostante la diminuzione della concentrazione del progesterone, al fine di chiarire il ruolo del progesterone endogeno, della prolattina e del progesterone esogeno correlando questi dati alla vitalità fetale riscontrata in gravidanza, in modo tale da evitare di trattare le cagne se non strettamente necessario.

Durante lo studio, tutti i soggetti HT non hanno mostrato alcun segno di infezione che potesse essere responsabile di aborto o riassorbimento embrionale. Sono state testate regolarmente per Herpes Virus canino, con risultato sempre negativo. Non sono state eseguite ulteriori indagini ematobiochimiche o batteriologiche durante lo studio e per questo altre cause di aborto/ riassorbimento, sebbene poco probabili, non possono essere completamente escluse.

Un ausilio in questo senso potrebbe provenire dalla concentrazione delle proteine di fase acuta, marker aspecifici di processi infiammatori (Céron et al., 2005; Eckersall, 2000). La loro concentrazione può aumentare in modo fisiologico in gravidanza (Ulutas et al., 2009; Céron et al., 2005; Root Kustritz, 2005). Quando si diagnosticano riassorbimenti embrionali o morte fetale, le proteine di fase acuta possono indicare la presenza di stati patologici infiammatori e quindi possono essere un utile strumento per escludere o

confermare cause di riassorbimento e aborto di tipo infiammatorio (Evans e Anderton, 1992). Le nostre analisi hanno valutato la concentrazione sierica di due proteine della fase acuta, la proteina C reattiva e la ceruloplasmina. La ceruloplasmina è stata valutata durante le settimane dalla 2 alla 6 di gestazione, periodo in cui avviene l'impianto degli embrioni in utero e la diagnosi di gravidanza ecografica. È emerso che non ci sono differenze significative nella concentrazione di questa proteina tra i due gruppi, sebbene nel periodo di analisi, in alcuni soggetti del gruppo trattato siano avvenuti dei riassorbimenti embrionali. Questo potrebbe significare che non ci sono stati processi infiammatori o infettivi che hanno portato al riassorbimento embrionale nelle cagne appartenenti al gruppo trattato. All'interno di ogni gruppo è stato riscontrato un effetto delle settimane di gestazione. Ciò significa che esiste una differenza significativa nella concentrazione della ceruloplasmina tra le settimane di gestazione all'interno di ogni singolo gruppo. In particolare esiste una differenza significativa tra le settimane 2-3 e 5-6 (wks 2-3 < wks 5-6). L'aumento della concentrazione della ceruloplasmina può essere fisiologico, in quanto la ceruloplasmina è una proteina di fase acuta intermedia e la sua concentrazione cresce e decresce in modo graduale (Vannucchi et al., 2002). Il suo andamento all'interno di ciascun gruppo può essere dovuto alla fase dell'impianto, che fisiologicamente porta ad una variazione delle proteine della fase acuta.

La proteina C reattiva è una proteina di fase acuta positiva maggiore, la cui concentrazione aumenta e decresce in poche ore in risposta ad uno stimolo infiammatorio (Cerón et al., 2005). Nel nostro studio la concentrazione di questa proteina è stata analizzata dalla settimana 2 alla settimana 9 di gestazione, in tre soggetti per ogni gruppo dello studio. Dalle analisi effettuate è emerso che non esistono differenze significative nella concentrazione sierica della proteina C reattiva tra i due gruppi durante le settimane dalla 3 alla 9 di gestazione. Durante la seconda settimana di

gestazione è stato possibile analizzare la concentrazione di proteina C reattiva (CRP) solo nel gruppo controllo, in quanto nel gruppo trattato, la concentrazione di questa proteina di fase acuta è risultata non determinabile. Durante questo periodo, la concentrazione di CRP del gruppo controllo è elevata, ma per noi è un dato poco affidabile, in quanto un campione dosato si discosta di molto dagli altri (8.97 mg/dl), comportando l'incremento medio della concentrazione settimanale della CRP. Questo valore deriva da un soggetto appartenente al gruppo controllo sottoposto a vaccinazione contro Herpes Virus canino durante la seconda settimana. Il vaccino potrebbe aver causato la reazione infiammatoria e quindi il rialzo della concentrazione di proteina C reattiva (Rudoler et al., 2015).

Durante le restanti settimane di gestazione, il fatto di non aver riscontrato alcuna differenza significativa tra i due gruppi indica ancora una volta la mancanza di una patologia infiammatoria che possa aver causato i riassorbimenti embrionali diagnosticati nel gruppo HT.

Per entrambe le proteine di fase acuta i dati a nostra disposizione non sono molto numerosi. In futuro sarebbe interessante approfondire questo aspetto della gravidanza aumentando la numerosità del campione, per poter utilizzare le proteine di fase acuta come markers per identificare anomalie nella gestazione riconducibili a processi infiammatori a stadi iniziali e quindi non ancora clinicamente manifesti.

Possiamo concludere che cagne di razza Pastore tedesco con anamnesi di riassorbimenti o aborti o segni di imminente aborto/riassorbimento sono spesso sospettate di insufficienza luteale e gli allevatori vogliono trattarle indipendentemente dalla concentrazione sierica del progesterone, come è avvenuto nei soggetti trattati arruolati nel nostro studio, nelle quali la supplementazione appare non indicata. Ogni caso di sospetto ipoluteinismo necessita di approfondimenti e di analisi che escludano altre

cause di aborti o riassorbimenti. Il solo monitoraggio della concentrazione di progesterone non è sufficiente per decidere di somministrare la supplementazione con progesterone esogeno. Studi futuri sarebbero necessari in quanto non è stata ancora stabilita la soglia di concentrazione di progesterone per ogni settimana di gestazione sotto la quale la gravidanza è a rischio e per capire approfonditamente il ruolo della prolattina in cagne ipofertili e con segni di riassorbimento embrionale in presenza di una normale concentrazione di progesterone. In quest'ottica sarebbe d'aiuto avere un gruppo controllo costituito da soggetti di razza Pastore Tedesco non trattati. I soggetti controllo di questo studio infatti sono di taglia e peso omogeneo rispetto ai soggetti trattati, ma sono di diverse razze e questo potrebbe aver influito sui risultati dai noi riscontrati.

Inoltre sarebbe interessante, per escludere cause infiammatorie della discesa del progesterone e per distinguere l'insufficienza luteale primaria dall'ipoluteinismo secondario, approfondire il ruolo della prolattina e le correlazioni esistenti con i markers dell'infiammazione.

L'esperimento 2 è focalizzato sul monitoraggio ecografico della gestazione nelle cagne di razza Pastore Tedesco. In particolare, l'aspetto affrontato è stato quello della stima dell'età gestazionale in questa razza.

Il risultato dell'applicazione della retta di regressione Groppetti et al. (2015) sui nostri dati di ICC ha evidenziato una sovrastima della lunghezza della gravidanza da parte della retta di regressione rispetto alla durata reale della gravidanza nei nostri soggetti. Ciò significa che secondo le formule di Groppetti et al. (2015) la gravidanza nelle nostre cagne sarebbe dovuta durare anche un periodo maggiore di 2 giorni rispetto a quanto è durata realmente. Questa sovrastima della durata della gestazione si verifica

maggiormente quando la misura dell'ICC è effettuata attorno ai 30-35 giorni di distanza dal parto (Figura n.1, Paper II). La retta elaborata da Groppetti et al. (2015) applicata ai nostri dati è più accurata quando mancano più di 35 giorni alla data di parto (Tabella n.1, Paper II), che corrisponde al periodo di gestazione in cui avviene la diagnosi ecografica di gravidanza e sono visualizzate le vescicole embrionali (Yeager et al., 1992). In questo periodo della gravidanza l'ICC è il parametro più affidabile per la stima della data di parto, perché più facilmente misurabile rispetto ad altri parametri fetali ed extra-fetali (Yeager et al., 1992). Questo risultato è in linea con altri studi, che hanno preso in considerazione cani di taglia media e piccola (Beccaglia e Luvoni, 2006) e di taglia grande e gigante (Alonge et al., 2016). Valutando l'accuratezza della stima della data di parto in base alla numerosità della cucciolata, l'ICC è più accurato quando le cucciolate sono composte da più di 4 cuccioli. L'errore considerato accettabile nella stima della data di parto è di  $\pm 1$  o  $\pm 2$  giorni. Questo risultato è in linea con i risultati di Groppetti et al. (2015) e potrebbe essere dovuto al fatto che gravidanza con un numero di feti inferiore a 3 ha una durata superiore a quella fisiologica (Eilts et al., 2005; Mir et al., 2011). Inoltre i feti, quando inferiori a 3 hanno più spazio a livello uterino, e quindi hanno anche la possibilità di crescere di più rispetto a feti di cucciolate più numerose. Le misurazioni in questi feti sono maggiori rispetto alla norma (Eilts et al., 2005; Mir et al., 2011).

I nostri dati di BP sui quali è stata applicata la retta di regressione lineare elaborata da Groppetti et al. (2015) hanno una maggiore accuratezza rispetto a ICC nella stima della data di parto, come si può evidenziare dalla Figura n.2 (Paper II). In base al periodo della gestazione in cui il parametro è misurato, si evidenzia che l'accuratezza di BP nel predire la data di parto è maggiore quando il parametro è registrato negli ultimi 15 giorni di gravidanza (Tabella n.4, Paper II). L'errore considerato accettabile è di  $\pm 1$  o

$\pm 2$  giorni. In questo periodo della gestazione, che solitamente corrisponde al momento in cui è effettuato lo studio radiografico per la conta dei cuccioli, i feti sono ben sviluppati e la calcificazione ossea è tale da permettere una buona visualizzazione delle ossa craniche (Lopate, 2008).

Come avviene per ICC, anche per il BP l'accuratezza della stima della data di parto è maggiore quando le cucciolate hanno una numerosità  $>4$  cuccioli (Tabella n.3, Paper II), raggiungendo un'accuratezza superiore al 90% quando la cucciolata è composta da 9 cuccioli e più. Anche in questo caso, l'errore considerato accettabile è di  $\pm 1$  o  $\pm 2$  giorni.

Nella seconda parte del lavoro abbiamo elaborato le rette di regressione lineare per la stima della data di parto per i parametri BD, CRL e DPTV.

BD è il parametro più accurato nel predire la data di parto. È possibile misurarlo durante la seconda parte della gestazione, quando sono visualizzabili le strutture addominali fetali (fegato e bolla gastrica) (Lopate, 2008). Il nostro risultato è in linea con gli studi precedenti, in cui BD è risultato avere una buona accuratezza nel predire l'età gestazionale e conseguentemente la data di parto (England et al., 1990; Kutzler et al., 2003; Son et al., 2001)

CRL perde invece di accuratezza a mano a mano che si avvicina il giorno del parto, a causa della flessione che naturalmente subisce il feto in crescita all'interno dell'utero materno (England et al., 1990). Inoltre mano a mano che la gravidanza prosegue, diventa sempre più difficile riuscire a ottenere un'immagine completa della lunghezza fetale e questo rende difficoltoso la misurazione del CRL (Luvoni e Beccaglia, 2006).

Il diametro della vescicola telencefalica (DPTV) è risultato essere il parametro meno accurato nel predire la data di parto, in linea con gli studi precedentemente condotti

(Beccaglia et al., 2008; Beccaglia e Luvoni, 2004). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che questa struttura è più difficile da visualizzare e misurare quando la gravidanza è vicina al termine, a causa dell'aumento della calcificazione delle ossa craniche (Beccaglia et al., 2008). Il DPTV può in ogni caso essere un ausilio nella predizione della data di parto, che non richiede un'estensione dell'esame ecografico in quanto è visualizzato nella stessa proiezione in cui è misurato il BP.

Per cercare di aumentare l'accuratezza delle rette di regressione lineare elaborate in questo lavoro sarebbe opportuno aumentare il numero di misurazioni per ciascun parametro.

Questo è il primo lavoro in cui sono state elaborate le rette di regressione lineare per la stima della data di parto in soggetti di razza specifica Pastore Tedesco per i parametri BD, CRL e DPTV.

Le rette di regressione lineare elaborate per BD, CRL e DPTV sono state applicate a misurazioni raccolte in 5 soggetti gravidi di razza Pastore Tedesco in cui non era noto il giorno dell'ovulazione.

Questa analisi ha confermato una maggiore accuratezza di BD rispetto agli altri due parametri, avendo il 71.43% di accuratezza con un errore di  $\pm 1$  giorno e 100% di accuratezza con un errore di  $\pm 1$  e  $\pm 2$  giorni.

CRL e DPTV hanno entrambi un'accuratezza di 60% con un errore di  $\pm 1$  giorno e dell'80% quando l'errore è di  $\pm 2$  giorni. L'accuratezza bassa di questi parametri potrebbe essere dovuta alla scarsità di misurazioni su cui le rette sono state testate. In futuro sarebbe interessante valutare, attraverso la raccolta di un numero maggiore di misurazioni, se è possibile confermare o migliorare questi dati sull'accuratezza.

Da questa valutazione preliminare è possibile affermare che le rette di regressione lineare da noi elaborate per BD e CRL stimano la data del parto in modo affidabile in soggetti ad ovulazione non nota.

Inoltre sarebbe interessante incrementare la numerosità delle misurazioni per ciascun parametro e verificarne l'accuratezza nel predire la data di parto in funzione della numerosità della cucciolata, del peso e dell'età della madre.

Nell'esperimento 3 è stata valutata l'efficacia del deslorelin nel posporre l'insorgenza della pubertà in gatte prepuberi.

L'impianto di deslorelin di 4.7 mg ha permesso di posporre la pubertà nelle gatte incluse nel nostro lavoro fino all'età di  $22.5 \pm 6$  mesi. Durante lo studio, parte del follow-up dei pazienti è stato perso per diverse motivazioni: un soggetto è deceduto in seguito a infezione da FeLV, uno è deceduto in seguito a un trauma, due soggetti sono scomparsi e un soggetto, per richiesta del proprietario, è stato sottoposto a intervento chirurgico di ovariectomia prima della fine dello studio. Possiamo in ogni caso affermare che segni di pubertà non sono comparsi almeno fino all'età di 15 mesi in tutti i 9 soggetti dello studio, fino a 19 mesi di età in 7/9 gatte, fino a 21 mesi in 6/9 gatte, fino a 24 mesi in 4/9 gatte e 25-36 mesi nelle rimanenti 3 gatte. Questo periodo è più lungo rispetto a ciò che è riportato nei precedenti studi, in cui la pubertà nella gatta è posticipata all'età di 4-12 mesi (Jemmett et al., 1977; Povey, 1978).

L'intervallo tra l'inizio del trattamento e l'insorgenza della pubertà nei soggetti inclusi nello studio è più lungo rispetto a quello riportato in altri studi in cui viene utilizzato l'impianto di 4.7 mg di deslorelin (Risso et al., 2012). Risso et al. (2012) hanno trattato

gatte di 100 giorni di età con un impianto di 4.7 mg di deslorelin e hanno osservato l'insorgenza della pubertà tra i 6 e i 14 mesi di età in 28/30 gatte. La ragione per cui l'intervallo trattamento-pubertà nei nostri soggetti è più lungo è difficile da spiegare. L'ambiente e la latitudine potrebbero essere dei fattori influenti, che possono influenzare il fotoperiodo. Risso et al. (2012) riportano dati registrati in una popolazione omogenea, mantenuta in ambiente di laboratorio, con condizioni precise di fotoperiodo (14 ore di luce; 10 ore di buio). questo non succede nel nostro studio, dove ogni soggetto è ricoverato presso la propria abitazione, con condizioni ambientali differenti. Un fotoperiodo naturale è rilevante in quanto causa un blocco naturale della ciclicità nelle specie stagionali: se il trattamento è effettuato quando il fotoperiodo naturalmente esercita un'azione di feedback negativo sull'asse ipotalamo-ipofisi (HPA), il calore o la pubertà possono essere posticipati ulteriormente, fino a che il fotoperiodo stimola HPA nuovamente. Il nostro studio è stato condotto alla latitudine di 45.24N, mentre lo studio di Risso et al. (2012) è stato condotto alla latitudine di 34.5S. La vicinanza all'equatore influenza il fotoperiodo e può stimolare l'insorgenza della ciclicità. Anche la dimensione della popolazione su cui è condotto lo studio può influenzare i risultati: i nostri dati completi riguardano un campione di 5 soggetti, mentre Risso et al. (2012) includono 28 gatte nel loro studio. In ogni caso, le nostre analisi dimostrano che l'insorgenza della pubertà in gatte trattate con un impianto di 4.7 mg di deslorelin può essere ritardata fino a 21-36 mesi di età.

In 3/9 soggetti (n. 2, 3 e 4) è stata riscontrata una completa cheratinizzazione delle cellule vaginali durante il primo mese post-trattamento. Questi soggetti, come tutti gli altri inclusi nello studio, erano state considerate allo stadio prepubere all'inizio dello studio, sulla base dell'anamnesi e degli esami clinici e riproduttivi, ma anche sulla base

del dosaggio degli ormoni. Queste 3 gatte sono state trattate all'età di 8, 8 e 9 mesi rispettivamente e tutte e tre sono state trattate in Gennaio. Considerando l'età, il peso (2.7, 2.3 e 3.5 kg rispettivamente) e il fotoperiodo, è possibile che questi soggetti fossero vicini all'insorgenza del loro primo estro. È possibile perciò che il deslorelin abbia provocato l'insorgenza dell'estro nel soggetto n.2. Le altre due gatte (n.3 e 4) hanno manifestato solamente un alto grado di cheratinizzazione delle cellule vaginali, senza gli altri segni comportamentali tipici del calore. Questo probabilmente è dovuto al fatto che il GnRH ha stimolato una minor secrezione dell'LH, che ha causato la crescita follicolare e la secrezione di estrogeni con conseguente cheratinizzazione delle cellule vaginali, ma non l'ovulazione. Questa minore secrezione di LH è stata osservata nelle femmine alla fine dell'anestro. Nella cagna alla fine dell'anestro aumenta la concentrazione di estradiolo, associata alla cheratinizzazione delle cellule vaginali, ma non a perdite vulvari ematiche. È possibile che questo fenomeno si sia verificato nelle gatte 3 e 4 del nostro studio, in cui il trattamento ha causato solo un minimo aumento dell'LH manifestatosi con la cheratinizzazione delle cellule vaginali. La pubertà si è invece manifestata quando è svanito l'effetto del trattamento. Questo aspetto necessita di essere approfondito attraverso ulteriori studi. Sebbene la pubertà nelle gatte domestiche può insorgere fino ai 12 mesi (Jemmet et al., 1977; Povey, 1978), il trattamento con deslorelin per posporre l'insorgenza della pubertà dovrebbe essere effettuato prima degli 8 mesi di età per avere l'effetto desiderato.

Il trattamento con deslorelin non ha provocato alterazione delle condizioni generali dei soggetti. Tutte le gatte erano in buone condizioni generali prima dell'inizio del trattamento e tutti i soggetti escluso uno (la gatta n.4 è deceduta a 27 mesi di età a causa della leucemia felina) hanno mantenuto buone condizioni durante lo studio. Tutti i

soggetti avevano libero accesso ad un giardino, nel quale potevamo venire in contatto con altri gatti e contrarre diverse patologie. Poiché nessun soggetto è stato testato per la leucemia felina prima dell'inizio dello studio e nessuno è stato vaccinato contro questo virus, ci è impossibile identificare il momento in cui il soggetto n.4 ha contratto l'infezione.

La fertilità al termine dell'effetto del deslorelin non è stata verificata in questo studio. Questo aspetto andrà indagato, in quanto di interesse clinico e pratico, perché i proprietari interessati a posporre l'insorgenza della pubertà o che richiedono una sterilizzazione reversibile, saranno sicuramente interessati a far riprodurre il proprio gatto e a mantenere la sua fertilità.

Il peso corporeo delle gatte incluse nel nostro studio è aumentato durante i mesi di monitoraggio e questo è probabilmente dovuto al fatto che i soggetti erano ancora in una fase di accrescimento. Sebbene questa possa essere un'indicazione del fatto che il deslorelin non blocca la crescita corporea dell'animale, una certezza in questo senso la avremo quando il dato sarà confrontato con quello raccolto in un gruppo di controllo.

Concludendo, il deslorelin può essere considerato un metodo sicuro con cui posporre la pubertà nella gatta, scevro da effetti collaterali e con un'azione che dura anche fino a 36 mesi di età. Deve essere somministrato prima degli 8 mesi di età e idealmente intorno ai 3-5 mesi per evitare di indurre l'insorgenza di segni di calore. L'aumento di peso e la crescita delle gatte non sembra essere influenzato dal trattamento.

Ulteriori studi saranno necessari per capire meglio la durata dell'effetto e la fertilità a seguito del trattamento con deslorelin in gatte prepuberi.



## **BIBLIOGRAFIA**

Alonge S, Beccaglia M, Melandri M, Luvoni GC (2016) “Prediction of whelping date in large and giant canine breeds by ultrasonography foetal biometry” *J Sma Anim Pract* 57:479-483.

Beccaglia M, Alonge S, Trovò C, Luvoni GC (2016) “Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update” *Reprod Domest Anim* 51(Suppl 1): 12-17.

Beccaglia M, Faustini M, Luvoni GC (2008) “Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus” *Reprod Dom Anim* 43: 367-370.

Beccaglia M, Luvoni GC (2004) “Ultrasonographic study during pregnancy of the growth of an encephalic portion in the canine foetus” *Vet Res Commun* 28, Suppl 1:161-164.

Becher A, Wehrend A, Goericke-Pesch S (2010) “Luteal insufficiency in the bitch-symptoms, diagnosis, consequences and therapy. A review of the literature” *TierarztlPraxAusg K Kleintiere Heimtiere* 38(6): 389-396 [in German].

Buff S (2009) “Physiology and endocrinology of pregnancy” *ESAVS-EVSSAR-ENVN* *Reproduction in companion, exotic and laboratory animal*, Nantes.

Cartee RE, Rowles T (1984) “Preliminary study of the ultrasonographic diagnosis of pregnancy and fetal development in the dog” *Am J Vet Res* 45: 1259-1265.

Céron JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S (2005) “Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives” *Vet Clin Pathol* 34: 85-99.

Concannon P, Butler WR, Hansel W, Knight PJ, Hamilton JM (1978) "Parturition and lactation in the bitch: serum progesterone, cortisol and prolactin" *Biol Reprod* 19: 1113-1118.

Concannon PW (2011) "Reproductive cycles of the domestic bitch" *Anim Reprod Scien* 124: 200-210.

Concannon PW, Weinstein P, Whaley S, Frank D (1987) "Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine" *J Reprod Fertil* 81: 175-180.

Concannon, P.W., Tsutsui, T., Shille, V. (2001): Embryo Development, hormonal requirements and maternal response during canine pregnancy. *Journal of Reprod Fertilsuppl* 57, 169-179.

Eckersall PD (2000) "Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals" *Revue Méd Vet* 7(151): 577-584.

Eilts BE, Davidson AP, Hosgood G, Paccamonti DL, Baker DG (2005) "Factor affecting gestation duration in the bitch" *Theriogenology* 64: 242-251.

England GCW, Allen WE, Porter DJ (1990) "Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age" *J Small Anim Pract* 31: 324-329.

England GCW, Russo M (2006) "Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches" *Theriogenology* 66: 1694-1698.

Evans JM, Anderton DJ (1992) “Pregnancy diagnosis in the bitch: the development of a test based on the measurement of acute phase proteins in the blood” *Ann Zootech* 41: 397-405.

Fontaine E, Mir F, Vannier F, Gerardin A, Albouy M, Navarro C, Fontbonne A (2011a) “Induction of fertile oestrus in the bitch using deslorelin, a GnRH agonist” *Theriogenology* 76: 1561–1566.

Gobello C (2012) “Effects of GnRH antagonist vs agonist in domestic carnivores, a review” *Reprod Domest Anim* 47: 373-376.

Gobello C, Herno G, Rodriguez R, et al. (2005) “Use of the GnRH antagonist, acyline, on oestrous cycle interruption in the bitch: a preliminary report” *Theriogenology* 64: 13.

Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, Wehrend A (2011) “Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin®, regarding suppression of reproductive functions in tomcats” *Theriogenology* 75: 803–810.

Goericke-Pesch S, Georgiev P, Atanasov A, Albouny M, Navarro C, Wehrend A (2013) “Treatment of queens in estrus and after estrus with a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin; hormonal response, duration of efficacy, and reversibility” *Theriogenology* 79: 640–646.

Goericke-Pesch S, Georgiev P, Wehrend A (2010) “The use of deslorelin in tomcats and queens” In: 7th European Veterinary Society Small Animal Reproduction (EVSSAR) Congress, Louvain-la-Neuve, Belgium, May 14–15, pp. 12–14.

Groppetti D, Vegetti F, Bronzo V, Pecile A (2015) "Breed-specific fetal biometry and factors affecting the prediction of whelping date in the German shepherd dog" *Anim Reprod Sci* 152: 117-122.

Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM (1994) "Diagnostic significance of the major acute-phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review" *Vet Bull* 64: 1009-1018.

Gudermuth DF, Newton L, Daels P, Concannon P (1997) "Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone" *J Reprod Fertil Suppl* 51: 177-184.

Günzel-Apel AR, Beste N, Nottorf S, Eshrieht F, Hoppen HO, Dieleman S, et al. (2009) "Comparison of selected endocrine parameters during luteal phase and pregnancy in German Shepherd dogs and Beagles" *Reprod Dom Anim* 44(Suppl 2): 59-64.

Günzel-Apel AR, Urhausen C, Wolf K, Einspanier A, Oei C, Piechotta M (2012) "Serum progesterone in pregnant bitches supplemented with progestin because of expected or suspected luteal insufficiency" *Reprod Dom Anim* 47(Suppl 6): 55-60.

Günzel-Apel AR, Zabel S, Bunck CP, Dieleman SI, Einspanier A, Hoppen HO (2006) "Concentration of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs" *Theriogenology* 66: 1431-1435.

Görlinger S, Galac S, Kooistra HS, Okkens AC (2005) "Hypoluteoidism in a bitch" *Theriogenology* 64: 213-219.

Hoffmann B, Busges F, Engel E, Kowalewski MP, Papa P (2004) "Regulation of corpus luteum-function in the bitch" *Reprod Dom Anim* 39: 232-240.

Janowski T, Fingerhut J, Kowalewski MP et al. (2014) “In vivo investigation on luteotropic activity of prostaglandins during early diestrus in nonpregnant bitches” *Theriogenology* 82: 915-920.

Jemmett JE, Evans JM (1977) “A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats” *J Small Anim Pract* 18: 31-37.

Johnson CA (2008) “High-risk pregnancy and hypoluteoidism in the bitch” *Theriogenology* 70: 1424-1430.

Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS (2001) “Canine parturition – eutocia and dystocia” In: Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS (eds), *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia, pp. 105-128.

Kim B, Son C (2007) “Time of initial detection of fetal and extra-fetal structures by ultrasonographic examination in Miniature Schnauzer bitches” *Veter Sci* 8(3): 289–293.

Kooistra HS, Okkens AC (2002) “Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review” *Mol Cell Endocrinol* 197: 167-172.

Kowalewski MP (2012) “Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review” *Reprd Dom Anim* 47(Suppl.6): 19-24.

Kowalewski MP, Fox B, Boos A, Reichler I (2012) “Prostaglandin E2 (PGE2) – the luteotropic factor of the gonadotropin-independent phase in the dog acts at the level of steroidogenic acute regulatory (STAR) protein” *Reprod Dom Anim* 47(Suppl. 2): 32.

Kowalewski MP, Michel E, Gram A, Boos A, Guscetti F, Hoffmann B, et al. (2011) “Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin

receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition” *Reprod Biol Endocrinol* 9: 109.

Krachudel J, Bondzio A, Einspanier R, Einspanier A, Gottschalk J, Kuechenmeister U, et al. (2013) “Luteal insufficiency in bitches as a consequences of an autoimmune response against progesterone” *Theriogenology* 79: 1278-1283.

Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M, Kawato K, Honjyo T, Fukuyama M, Yamamoto S (2003) “Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagles dogs” *Exsperimental Animals/Japanese Associations for Laboratory Animal Science* 52: 387-390.

Kutzler MA (2015) “Alternative methods for feline fertility control use of melatonin to suppress reproduction” *JFMS* 17: 753-757.

Kutzler MA, Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen VN (2003) “Accuracy of canine parturition date prediction using fetal measurement obtained by ultrasonography” *Theriogenology* 60: 1309-1317.

Lopate C (2008) “Estimation of gestational age and assesment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review” *Theriogenology* 70: 397-402.

Lucas X (2014) “Clinical use of deslorelin (GnRH agonist) in companion animals: a review” *Reprod Domes Anim (Suppl 4)* 49: 64-71.

Luvoni GC, Beccaglia M (2006) “The prediction of parturition date in canine pregnancy” *Reprod Dom Anim* 41: 27-32.

Luvoni GC, Grioni A (2000) "Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonographic fetal measurements" *J Small Anim Pract* 41: 292-294.

Milani C, Romagnoli S, Mollo A, Ometto T, Stelletta C, Gelli D (2006) "A rise in haptoglobin and ceruloplasmin concentration signals implantation during the canine pregnancy" *Proceeding of 5<sup>th</sup> biannual EVSSAR congress, 7<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> April 2006, Budapest, Hungary, p.325.*

Mir F, Billault C, Fontaine E, Sendra J, Fontbonne A (2011) "Estimated pregnancy length from ovulation to parturition in the bitch and its influencing factors: a retrospective study in 162 pregnancies" *Reprod Domest Anim* 46: 994-998.

Onclin K, Murphy B, Verstegen JP (2002) "Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches" *Theriogenology* 57: 1957-1972.

Onclin K, Silvia LD, Donnay I, Verstegen JP (1993) "Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of dopamine agonist, cabergoline" *J Reprod Fertil (Suppl.47)*: 403-409.

Onclin K, Verstegen JP (1997) "Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches" *J Reprod Fertil* 51: 203-208.

Onclin K, Verstegen JP, Concannon PW (2000) "Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy" *J Reprod Fertil* 118: 417-424.

Papa PC, Hoffmann B (2011) “The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones” *Reprod Dom Anim* 46: 750-756.

Povey RC (1978) “Reproduction in the pedigree female cat. A survey of breeders” *Can Vet journal La Rev vétérinaire Can* 19: 207-213.

Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, Viaris de Lesegno C, Saint-Dizier M, Chastant-Maillard S (2006) “In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review” *Theriogenology* 66: 1685-1693.

Risso A, Corrada Y, Barbeito C, Diaz JD, Gobello C (2012) “Long-term-release GnRH agonist postpone puberty in domestic cats” *Reprod Domest Anim* 47: 936–938.

Roby RR, Richardson RH, Vojdani A (2006) “Hormone allergy” *Am J Reprod Immunol* 55: 307-313.

Romagnoli S (2015) “Progestins to control feline reproduction: historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses” *JFMS* 17: 743-752.

Root-Kustritz MV (2005) “Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog” *Theriogenology* 64: 755-765.

Root-Kustritz MV (2005) “Reproductive behavior of small animals” *Theriogenology* 64(3): 734-746.

Root-Kustritz MV “Use of supplemental progesterone in management of canine pregnancy” In: “Recent advances in small animal reproduction” Concannon PW, England G, Verstegen IIIJ and Linde-Forsberg C. (Eds.) *International Veterinary Information Service Ithaca NY*([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) Last updated: 21-apr-2001.

Rota A, Charles C, Starvaggi Cucuzza A, Pregel P (2015) “Diagnostic efficacy of a single progesterone determination to assess full-term pregnancy in the bitch” *Reprod Domest Anim* 50(6): 1028-1031.

Rube A, Corrada Y, Aris D, Gobello C (2007) “Progesterone insufficiency in bitches in early and late dioestrus” *Vet Rec* 160: 524-525.

Rudoler N, Harrus S, Martinez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Van Straten M, Cerón JJ, Baneth G (2015) “Comparison of the acute phase protein and antioxidant responses in dogs vaccinated against canine monocytic ehrlichiosis and naïve-challenged dogs” *Parasites & Vectors* 8: 175.

Socha P, Janowski T, Bancercz-Kisiel A (2015) “Ultrasonographic fetometry formulas of inner chorionic cavity diameter and biparietal diameter for medium-sized dogs can be used in giant breeds” *Theriogenology* 84: 779-783.

Son C, Jeong K, Kim J, Park I, Kim S, Lee C (2001) “Establishment of prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs” *J Veter Med Sci* 7: 715-721.

Sontas, B.H., Speroni, M., Stelletta, C., Günzel-Apel, A.R., Romagnoli, S. (2012): A systemic review and meta-analysis of serum progesterone patterns in the pregnant bitch. *Proceedings of 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, July 29-August 2, Vancouver, Canada, p.247-248.

Steinetz B, Goldsmith LT, Hasan SH, Lust G (1990) “Diurnal variation of serum progesterone, but not relaxin, prolactin or estradiol-17 $\beta$  in the pregnant bitch” *Endocrinology* 127: 1057-1063.

Tibold, A., Thuróczy, J. (2009): Progesterone, oestradiol, FSH and LH concentrations in serum of progesterone-treated pregnant bitches with suspected luteal insufficiency". *Reprod Dom Anim* 44(Suppl. 2),129-132.

Toydemir TSF, Kılıçarslan MR, Olgaç V (2012) "Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats" *Theriogenology* 77: 662–74.

Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle AG, Walsh J, (2001) "Use of a GnRH analogue implant to produce reversible suppression of reproductive function in male and female domestic dogs" *J Repro Fertil Suppl* 57, 255–261.

Tsutsui, T (1983) "Effects of ovariectomy and treatment on the maintenance of pregnancy in bitches" *Nippon Juigaku Zasshi* 45: 47-51.

Uhlmann J, Muennich A, Gabler C, Bondzio A, Kuechenmeister U, Einspanier R (2015) "Autoimmune reaction as a cause for luteal insufficiency in bitches" *Proceedings of 18th EVSSAR Congress, September 11<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, Hannover, Germany, p.133.*

Ulutas PA, Musal B, Kiral F, Bildik A (2009) "Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches" *Res Vet Sci* 86(3): 373-376.

Vannucchi CI, Mirandola RM, Oliveira CM (2002) "Acute-phase protein profile during gestation and diestrus: proposal for an early pregnancy test in bitches" *Anim Reprod Sci* 74: 87-99.

Verstegen J, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K (2008) "Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: a review" *Theriogenology* 70(3): 304-319.

Verstegen-Onclin K, Verstegen J (2008) “Endocrinology of pregnancy in the dog: a review” *Theriogenology* 70: 291-299.

Yeager AE, Mohammed HO, Meyers-Wallen V, Vannerson L, Concannon PW (1992) “Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in Beagles” *Am J Vet Res* 3: 342-351.



## **PAPER I**

PROGESTERONE AND PROLACTIN SERUM CONCENTRATION IN BITCHES SUPPLEMENTED WITH EXOGENOUS PROGESTERONE DURING THE SECOND HALF OF PREGNANCY IRRESPECTIVE OF THEIR OVARIAN PROGESTERONE SECRETION.

M. Cecchetto, S. Romagnoli, T. Badon, B. Contiero, S. Bedin, A. Salatin, C. Milani

[[marta.cek84@alice.it](mailto:marta.cek84@alice.it)]

Department of Animal Medicine, Production and Health; University of Padua, Italy.

**Key Words:** dog, progesterone, prolactin, pregnancy, progesterone supplementation.

## Abstract

In order to verify the role of Progesterone (P4) supplementation in cases with an history of resorptions associated with low serum P4 concentration, 10 pregnant German shepherd bitches were assigned to an Hypofertile Treated group (HT). They were treated irrespectively from their P4 concentration with natural progesterone, 2mg/kg IM, when pregnancy was diagnosed by US. Twelve pregnant bitches were assigned to a Non-Treated (NT) group with these criteria: history of normal pregnancy; no hormonal treatment; no US abnormalities during current pregnancy. Blood samples were collected throughout pregnancy, in order to assay P4 and Prolactin (PRL). Data were analysed using a repeated measure ANOVA for P4, and Mann-Whitney non parametric test for PRL, considering weeks of pregnancy (1-9 weeks) for comparing the two groups. No significant difference in P4 concentration between HT and NT throughout pregnancy was found. A significant difference in PRL concentration was observed between HT and NT during weeks 2 - 7 ( $P < 0.001$ ). Within HT, a significant increase in weekly PRL concentration was observed ( $wk2-3 < wk5-7 < wk8-9$ ). Two NT bitches were excluded because of signs of resorptions during US. Their PRL serum concentration was comparable to those of HT. P4 concentration showed a drop in one of them (4.5 ng/ml at 43 days post LH peak). In half of HT, P4 supplementation may have been superfluous. Further studies are needed in order to understand the physiological P4 threshold for every week of pregnancy and the role of low PRL in bitches with resorptions with low or high P4 concentrations.

## 1. INTRODUCTION

The luteal phase lasts approximately 2 months in pregnant and non-pregnant bitches (Concannon et al., 1977). Progesterone (P4) is required for maintenance of pregnancy (Hoffmann et al., 2004). Corpora lutea are the only source of P4 during canine gestation (Tsutsui, 1983), their highest synthetic capacity being between days 20 and 35 post-ovulation, when P4 reaches peripheral serum concentrations of 15-80 ng/ml (Concannon, 2011; Papa et al., 2011). Subsequently, serum P4 starts a gradual descent and then abruptly drops below 2.0 ng/ml (Concannon, 2011; Verstegen-Onclin et al., 2008) just 1-2 days prior to parturition.

The complex process of luteal regulation involves several hormones, the most important being P4 and prolactin (PRL), but also luteinizing hormone (LH), estradiol and relaxin play a role (Verstegen-Onclin et al., 2008). Ovarian P4 production is independent from luteotrophic support by the pituitary during the first weeks of gestation in the bitch (Okkens 1986). Prolactin and LH are responsible for maintaining luteal function (Onclin et al., 1997; Onclin et al., 2000), but while LH seems to have a permissive role on P4 production, PRL appears to be the most relevant pituitary hormone supporting luteal steroidogenesis from day 8 onwards (Concannon et al, 1987). The luteotrophic effect of PRL is mediated by the expression of specific prolactin receptors (PRLr) on the luteal cells. Canine corpora lutea show elevated PRLr expression until mid-gestation followed by a pre-partum downregulation (Kowalewski et al., 2011).

Hypoluteoidism is an insufficient production of P4 by corpora lutea leading to embryo resorption, abortion or premature delivery in the absence of any other sign of infection, genetic abnormalities of puppies, trauma or metabolic disease (Root-Kustritz et al., 2001; Görlinger et al, 2005;Uhlmann et al., 2015). Many authors indicate 2.0 ng/ml as

threshold of P4 concentration for maintaining the canine pregnancy (Görlinger et al., 2005; Johnson, 2008; Becher et al, 2010), while others consider a decrease to 5.0 ng/ml at the 4<sup>th</sup>-5<sup>th</sup> week of pregnancy a critical event that may cause a pregnancy loss (Root Kustritz, 2001). However, a P4 decline may also be secondary to fetal death rather than being the primary cause (Günzel-Apel et al., 2006).

Clinical signs suggestive of luteal insufficiency are history of partial or total embryo resorption or abortion during the previous cycle, short interoestrous intervals, mild to significant vaginal discharge, signs of impending parturition, premature delivery with stillborn puppies, low fetal heart rate and signs of resorption detected on ultrasound (Root- Kustritz, 2001; Görlinger et al, 2005; Becher et al, 2010; Robe et al, 2007).

A relationship between low PRL and low P4 production could be hypothesized in the pathogenesis of hypoluteoidism (Günzel-Apel et al., 2012). A low PRL concentration in short-cycling and normo-cycling German shepherd bitches during luteal phase has been described (Becher et al., 2010;Günzel-Apel et al., 2009) leading the authors to postulate a breed specific low PRL secretion as a cause of reduced luteal function.

When P4 drops during pregnancy below the threshold in the absence of any other sign of disease, P4 supplementation is the treatment of choice. The active ingredient most frequently used for this purpose is natural P4 administered orally or intramuscularly, or progestins, such as medroxyprogesterone acetate or altrenogest (Becher et al., 2010).

In clinical practice, owners of bitches with history of pregnancy failure or resorption and fetal loss often demand their bitches to be treated as soon as P4 starts dropping rapidly (even if it does not go below the threshold) because of psychological stress of facing a decrease in P4 concentration potentially leading to pregnancy loss (Becher et al., 2010; Tibold et al., 2009; Krachudel et al., 2013).

The perception of the risk for a particular breed considered predisposed to luteal deficiency, as is the German shepherd breed, may lead to overestimate the need for P4 supplementation particularly if daily or weekly fluctuations in P4 concentrations are interpreted as sudden drops. This work was undertaken to study the concentration of P4 and PRL in a sample of pregnant German shepherd bitches with a history of resorption who were treated by their owner with P4 (irrespective of their serum P4 concentration), and compare their hormonal values with P4 and PRL data from a) a group of healthy adult bitches experiencing a normal pregnancy and b) a group of untreated pregnant bitches with signs of resorption. The aim of our study was to verify whether or not in bitches with history of pregnancy failure or resorption and fluctuation/s of P4 leading to a rapid fall of P4 concentration, supplementation of P4 should be given blindly based just on history.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Ten female German Shepherd dogs coming from a kennel whose owner treats routinely pregnant bitches with a P4 compound marketed for human use were selected for this study provided that they fulfilled the following criteria: a) pluriparous bitches; b) bitches with a history of resorptions or short interestrus intervals (less than 4.5 months); c) bitches experiencing a rapid fall in serum P4 concentrations during previous pregnancy/ies and therefore undergoing treatment with a natural P4 supplementation at the current pregnancy (Table n.1). These animals were 3-7 ( $4.6 \pm 1.65$ ) years of age and 28-36 ( $32.4 \pm 2.68$ ) kg body weight (BW), and were routinely tested for herpesvirus, but not for thyroid function or canine brucellosis. These 10 bitches were defined as hypofertile treated (HT) group. In an effort to compare results from HT bitches, a group

of 12 pregnant bitches was identified and defined as non treated (NT) bitches. These bitches were of different breeds and belonging to different breeders (2 Collies, 5 Flat Coated Retrievers, 4 Boxers, 1 Staffordshire Bull Terrier), were 2-8 ( $4.17 \pm 1.64$ ) years of age and 21-30 ( $28.2 \pm 4.73$ ) kg BW. Inclusion criteria for NT bitches were as follows: a) history of normal pregnancy or normal interestrus interval (more than 5months); b) absence of any hormonal treatment during pregnancy; c) no ultrasonographic abnormalities revealed during the current pregnancy (Table n.2).

In all patients a clinical examination was performed prior to ovulation which included vaginal cytology and collection of a 5.0 ml blood sample for serum P4 assay. The day of ovulation was established when serum P4 concentration was 4-10 ng/ml (Concannon, 2011). Breedings or artificial inseminations were planned on the basis of P4 assay results, 4-6 days post LH peak. The day of the LH peak was estimated as occurring 2 days before ovulation (Concannon, 2011). Subsequently, blood sampling was performed bi-weekly throughout the luteal phase in the HT bitches and at least once a week for NT bitches.

Blood samples were collected by cephalic venipuncture between 8:00 and 9:00 am in serum vials and centrifuged at 2300 g for 5 minutes 10-30 minutes post-collection. Serum P4 was assayed using a chemiluminescence method (CLIA, Immulite® 1000, Medical System, Siemens, UK) validated for the dog (Kutzler et al., 2003). Prolactin was assayed using an ELISA technique specific for canine PRL (Prolactin® Canine Elisa; Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany), with a range of calibration of 0-80 ng/ml and a lowest limit of detection of 0.4 ng/ml.

Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound (US), using a General Electric Medical System LOGIQ P5/A5 (Soligen, Germany) equipment with a multi-frequency

(6-10 MHz) convex probe, as early as 25 days after the LH peak. Bitches were followed up with uterine US to monitor foetal growth, foetal heart frequency, foetal anatomy and to look for evidence of resorption sites (England and Russo, 2006). US examinations were performed by two operators whose performance in canine reproductive ultrasonography had been shown not to differ statistically (Cecchetto et al., 2014).

The HT bitches of our study were treated with a natural P4 compound marketed for human use (Prontogest®, Farmaceutici Italia S.r.l.) 2.0 mg/kg IM from day 26 post-LH peak onwards, administered every third day until 5 days prior to the expected delivery date.

#### *Statistical Analysis*

All analysis were performed using SAS (Institute Inc., Cary, NC, USA). Values with more than three standard deviations from the mean were considered outliers and removed from the dataset. Normality of distribution of data was checked with Shapiro - Wilk test. Normally distributed variable was analysed using an ANOVA for repeated measures, considering weeks of pregnancy (1-9 weeks, time effect), treatment (HT vs NT) and their interaction as factors. Weeks of pregnancy were calculated from the day of LH peak (Day 0). Data are reported as least square means  $\pm$  standard error of the means (SEM).

Not normally distributed variable was compared between treatment groups (HT and NT) using the non-parametric Mann-Whitney test, while differences across weeks of pregnancy (1-9 weeks) were analysed with the Kruskal-Wallis non-parametric test. Not normally distributed data were tabulated as median and interquartile range. Post-hoc pairwise contrasts between least squares-means and mean ranks (for normally and not

normally distributed data, respectively) were performed using Bonferroni correction. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTS

In the HT group, 5/10 bitches (n. 5, 6, 7, 8 and 10) showed a drop in P4 concentration of about 10 ng/ml between two consecutive assays between the 3<sup>rd</sup> and 5<sup>th</sup> week of pregnancy. In bitch n. 5, no resorption was documented but P4 dropped from 36.1 ng/ml to 19.6 ng/ml ( $\Delta P4 = 16.5$  ng/ml) during days 19 – 27 from the LH peak and she whelped 5 live puppies on day 66 from LH peak. In bitch n. 6 multiple resorptions were seen at pregnancy diagnosis when P4 dropped from 32.7 ng/ml to 25.4 ng/ml ( $\Delta P4 = 7.3$  ng/ml) at week 3; she whelped 9 live normal puppies on day 60 from the LH peak. In bitch n. 7 the drop of P4 from 27.5 ng/ml to 12 ng/ml ( $\Delta P4 = 15.5$  ng/ml) was observed at day 28 - 31 from the LH peak, and she whelped 9 live normal puppies on day 63 from the LH peak. In bitch n. 8 serum P4 concentration decreased from 19.4 ng/ml to 8.7 ng/ml ( $\Delta P4 = 10.7$  ng/ml) at days 11 - 19 from the LH peak, and she whelped on day 63 from LH peak. In bitch n. 10 multiple resorptions were seen at pregnancy diagnosis and P4 concentration was 5.0 ng/ml on day 31 post LH peak; the P4 supplementation in this bitch was started on day 31, ultrasonographic evidence of resorptions was observed also during treatment and she whelped 1 live normal pup by C-section on day 63 from the LH peak. The remaining 5 HT bitches (n. 1, 2, 3, 4 and 9) did not show any drop in serum P4. Bitch n. 4 did not show any ultrasonographic evidence of resorption and whelped 6 live normal pups on day 64 from LH peak. Bitches n.1, 2, 3 and 9 had uneventful pregnancies and whelped on days 64, 66, 64, and 64 from LH peak, respectively. Unfortunately, ultrasound monitoring could not be obtained in these 4

animals and litter size could only be obtained for bitch n. 1 and 2 who whelped 3 (plus 4 stillborn) and 3 normal live pups, respectively.

All NT bitches had normal pregnancies as far as length and occurrence of abortion, and whelped  $6.58 \pm 3.4$  pups on day  $65.33 \pm 1.72$  (Mean $\pm$ SD) from the LH peak. Two NT bitches, n.21 and 22, had ultrasonographic evidence of multiple resorptions. In the first bitch, 3 resorptions and 6 viable fetuses were observed on US at day 23 after the LH, and she subsequently whelped 6 pups through C-section on day 65 after the LH peak. In the second bitch 2 resorptions and 3 viable fetuses were seen at day 36 after LH peak and she subsequently whelped 2 live normal pups 67 days after the LH peak. Both bitches were not treated with any hormonal compound. Because these two bitches failed to fulfill the third criteria (no ultrasonographic abnormality observed during pregnancy) they were removed from the NT group, excluded from statistical analysis and described separately.

Least square means on P4 concentrations in the HT and NT animals during the 9 weeks of pregnancy are reported in Table n. 3 and depicted in Figure n. 1. Two outlier data, belonging to week 6 in HT group were excluded for the statistical analysis. Data of P4 concentration were normally distributed. ANOVA failed to reveal any significant difference in P4 concentration between the HT and NT bitches throughout pregnancy. Albeit normal, serum P4 concentrations in HT bitches were significantly lower in week 5 compared to week 4 (week 4 =  $22.05 \pm 1.34$  ng/ml; week 5 =  $13.84 \pm 1.34$  ng/ml;  $P < 0.05$ ) (Figure n. 1). In two/10 HT bitches (n. 8 and n. 10) serum P4 concentrations obtained in week 5 were 6.7 and 5.0 ng/ml, respectively. In the remaining 8 HT bitches serum P4 concentration during week 5 was above 9.0 ng/ml (9.5 – 25.3 ng/ml).

Data of PRL concentration were not normally distributed. The Mann-Whitney test revealed a significant difference in PRL concentration between HT and NT groups during weeks 2 through 7 ( $P < 0.001$ , Table n. 4). Considering the HT group, a significant increase in weekly PRL concentration was observed by the Kruskal-Wallis non parametric test, with values of weeks 2-3  $<$  weeks 5-7  $<$  weeks 8-9 ( $P < 0.05$ ; Table n.4).

Data of P4 and PRL concentrations of the two NT-excluded bitches are showed in Figures n. 2 and n. 3. Their median PRL serum concentrations were 11.90 ng/ml (range 6.64-17.87 ng/ml) and 14.20 ng/ml (range 6.74-20.33 ng/ml) in bitch n. 21 and 22, respectively; also, serum P4 of one of these 2 NT-excluded bitches dropped below the threshold considered as a risk of pregnancy failure at day 43 (4.5 ng/ml, see Figure n.2). In spite of this, both bitches carried the remaining viable foetuses to term.

#### 4. DISCUSSION

In the HT group, 5/10 bitches (n. 1, 2, 3, 4 and 9) did not show any rapid drop of serum P4 concentration. In 1/5 (n. 10) of the remaining HT bitches, a concentration below 5.0 ng/ml was observed at 31 days from LH peak together with evidence of resorption at US; the remaining 4 HT bitches (n. 5, 6, 7, 8) had a sudden drop in serum P4 ( $\Delta P4 = 10$  ng/ml) with or without evidence of embryo resorption. Also, in patients n. 8 and 10, serum P4 concentration was close to the threshold at 31 days post the LH peak (Root-Kustritz, 2001) (6.7 ng/ml and 5.0 ng/ml, respectively). Such a decrease, together with ultrasonographic evidence of resorption in the absence of any other evident sign of disease (such as in bitch n. 10), may constitute a clear indication for exogenous P4 supplementation because of the potential risk of pregnancy loss.

Mean serum P4 concentration of HT bitches did not differ statistically from NT bitches throughout pregnancy. The use of natural P4 as a treatment made it impossible to distinguish endogenous P4 secretion starting from the end of 4<sup>th</sup> week of pregnancy until parturition, because hormonal assay systems do not differentiate between exogenous and endogenous P4. However, the mean P4 concentration of HT bitches significantly dropped about 10 ng/ml from week 4 to week 5 (Table n.3) despite the onset of P4 supplementation. Such a drop of P4 concentration despite treatment is difficult to justify: during the second half of pregnancy blood volume, liver clearance and placental metabolism increase and this may lead to a lower P4 serum concentration (Concannon et al., 2001). A serum P4 drop may be due to an insufficient P4 supplementation, but this hypothesis cannot be tested given the current experimental design. However a 11.9 ng/ml drop in serum P4 was observed also in one of our control bitches (bitch n. 16) at days 9 – 15 from LH peak and a 13.2 ng/ml drop was detected in the same bitch at days 23 – 29 from LH peak. In bitches as in women, a fall in serum P4 concentration may be due to an autoimmune disease causing the development of anti-P4 antibodies (Uhlmann et al., 2015). Anti-P4 antibodies may interfere with exogenous P4 supplementation and also with the results of P4 assay. It would be interesting to investigate the presence of anti-P4 antibodies in serum samples of our HT bitches in order to verify whether or not autoimmunity may play a role.

A short interestrus interval may lead to a shorter than normal luteal phase; treatment with exogenous P4 during pregnancy is often advised when bitches are presented with this history (Günzel-Apel et al., 2006). Supplementation is currently advised when P4 concentration drops under the threshold considered for pregnancy maintenance or when P4 decrease about 10 ng/ml within two consecutive assays (Krachudel et al., 2013), with evidence of embryo resorption at US, vaginal discharge, nesting, impending

abortion and/or decreased appetite (Günzel-Apel et al., 2009). Although 2.0 ng/ml is indicated as the threshold below which pregnancy may be compromised, cases of luteal insufficiency and resorptions have been described in which bitches had a P4 concentration higher than 2.0 ng/ml (Görlinger et al., 2005; Rube et al., 2007). Unfortunately these studies involved just a few bitches and were not focused to identify a significant P4 threshold indicating the appropriate time to start a P4 supplementation. The identification of a serum P4 threshold in bitches with suspected luteal insufficiency is complicated by the fact that P4 supplementation may compromise the diagnosis of hypoluteoidism because of a) impossibility to differentiate between endogenous and exogenous P4 when using natural P4 compounds and b) the fact that synthetic P4 compounds, albeit distinguishable from endogenous P4, may prevent resorption and/or abortion thus making identification of a threshold impossible (Günzel-Apel et al., 2006; Günzel-Apel et al., 2009; Günzel-Apel et al., 2012; Tibold et al., 2009; Krachudel et al., 2013). Establishing a weekly threshold of P4 below which there is a risk of pregnancy loss would be a helpful information for clinicians dealing with bitches with suspected luteal insufficiency (Sontas et al., 2012).

PRL concentration was significantly lower in HT when compared to NT bitches in weeks 2-7. Within HT bitches there was a significant difference in serum PRL concentrations between weeks with values of weeks 2-3 < weeks 5-7 < weeks 8-9 (Table n. 4). The difference in serum PRL concentrations in HT bitches before and after P4 supplementation is puzzling: endogenous or exogenous P4 can suppress PRL secretion (Günzel-Apel et al., 2006), but in our study PRL values significantly increased as parturition day was approaching. Lower than normal PRL concentrations have been reported in German shepherd bitches with short interestrus intervals and in

cases of a suspected luteal deficiency (Günzel-Apel et al., 2006). As PRL is one of the major luteotrophic factors, its low concentration in early pregnancy may be a determining factor in bitches with an early decline in P4. However, it remains unclear why PRL concentration increased despite supplementation with P4 in HT, until reaching a concentration not significantly different to NT group in the last weeks of pregnancy (8-9 weeks). Such a progressive increase in PRL concentrations may be related to the lowering of serum P4 within the mammary gland activation mechanism. To our knowledge, a PRL increase during pregnancy in bitches with suspected luteal insufficiency has never been reported before: the reason/s for such an increase are unclear and its significance deserves further studies. Onclin and Verstegen (1997) reported an increase of plasma PRL around day 25 of pregnancy, having a peak value at parturition.

Interestingly, the 2 control bitches which were excluded from the statistical analysis because of US evidence of embryo resorption had very low PRL concentrations, comparable to those of the HT bitches. Their serum P4 was never below 5.0 ng/ml in one of them, while in the other it was 4.5 ng/ml at day 43 post LH peak. To our knowledge, this is the first report of low PRL concentration in pregnant bitches with signs of resorption/s carrying pregnancy to term without P4 supplementation. Further studies of non treated pregnancies in the face of a drop of P4 concentration may be necessary in order to clarify the role of endogenous P4 and PRL, the role of P4 supplementation and to correlate it to US evidence of low fetal vitality, as this would allow veterinarians to avoid unnecessary P4 treatments in bitches with suspected luteal insufficiency.

During the study our HT bitches did not show any sign of infectious disease responsible for abortion or resorption. These bitches are routinely tested for antibody titers against

Canine Herpes Virus once a year and such test has always been negative throughout the study. No further blood exams or bacteriology were performed during the study, therefore other causes of abortions/resorptions (although unlikely, as the bitches were always in good health) cannot be ruled out.

To conclude, bitches with history of resorptions or abortions and/or signs of impending resorption/abortion are often suspected of luteal insufficiency and their breeders want to treat them irrespectively of their serum P4 value: such a decision may prove unnecessary, as it happened in 50% of the treated bitches of our study in which P4 supplementation may have been superfluous. Every case of suspected luteal insufficiency needs an in-depth assessment and follow up in order to rule out other causes of pregnancy loss, decide which therapy works best and monitor its effectiveness, as the simple measurement of serum P4 concentration may not be enough to make a decision about P4 supplementation. Perhaps sequential monitoring and comparison of serum P4 values across time looking for a sharp decrease is a better option: only 2/10 of our HT bitches had a P4 serum concentration under the currently recognized threshold of 5.0 ng/ml, while 4/10 HT bitches had a drop of 10 ng/ml serum P4.

Further studies are needed in order to better understand which is the P4 threshold for every week of pregnancy and which is the role of the low PRL concentration in hypofertile bitches and especially in bitches with signs of resorptions with low or normal P4 concentrations.

In order to rule out causes of low progesterone, and in order to distinguish secondary from primary luteal deficiency, the role of PRL and the correlation with markers of inflammation or of autoimmune reaction against P4 should also be evaluated.

## BIBLIOGRAPHY

Becher, A., Wehrend, A., Goericke-Pesch, S. (2010): Luteal insufficiency in the bitch-symptoms, diagnosis, consequences and therapy. A review of the literature. *TierarztlPraxAuszg K Kleintiere Heimtiere* **38**(6),389-396 [in German].

Cecchetto M, Milani C, Vencato J, Rota A, Mollo A, Romagnoli S (2014): Gestational age and parturition date estimation by ultrasonographic measurement of foetal and extra-foetal parameters in German Shepherd bitches". Proceedings of 17th EVSSAR Congress, September 26th, Wroclaw, Poland, p.143.

Concannon, P.W. (2011): Reproductive cycles of the domestic bitch. *AnimReprod Scien* **124**:200-210.

Concannon, P.W., Powers, M.E., Holder, W., Hansel, W. (1977): Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* **19**:517-526.

Concannon, P.W., Tsutsui, T., Shille, V. (2001): Embryo Development, hormonal requirements and maternal response during canine pregnancy. *Journal of Reprod Fertilsuppl* **57**, 169-179.

Concannon, P.W., Weinstein, P., Whaley, S., Frank, D. (1987): Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. *J Reprod Fertil* **81**,175-180.

England, G.C.W., Russo, M. (2006): Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology* **66**,1694-1698.

Günzel-Apel, A.R., Beste, N., Nottorf, S., Esehrieh, F., Hoppen, H.O., Dieleman, S., et al (2009): Comparison of selected endocrine parameters during luteal phase and

pregnancy in German Shepherd dogs and Beagles. *Reprod Dom Anim* **44**(Suppl 2),59-64.

Günzel-Apel, A.R., Urhausen, C., Wolf, K., Einspanier, A., Oei, C., Piechotta, M. (2012): Serum progesterone in pregnant bitches supplemented with progestin because of Expected or suspected luteal insufficiency. *Reprod Dom Anim* **47**(Suppl 6),55-60.

Günzel-Apel, A.R., Zabel, S., Bunck, C.P., Dieleman, S.I., Einspanier, A., Hoppen, H.O. (2006): Concentration of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs. *Theriogenology* **66**,1431-1435.

Görlinger, S., Galac, S., Kooistra, H.S., Okkens, A.C. (2005): Hypoluteoidism in a bitch. *Theriogenology* **64**,213-219.

Hoffmann, B., Busges, F., Engel, E., Kowalewski, M.P., Papa, P (2004): Regulation of corpus luteum-function in the bitch. *Reprod Dom Anim* **39**:232-240.

Johnson, C.A. (2008): High-risk pregnancy and hypoluteoidism in the bitch. *Theriogenology* **70**,1424-1430.

Kooistra, H.S., Okkens, A.C. (2002): Secretion of growth hormone and prolactin during progression of the luteal phase in healthy dogs: a review. *Mol Cell Endocrinol* **197**,167-172.

Kowalewski, M.P., Michel, E., Gram, A., Boos, A., Guscetti, F., Hoffmann, B., et al.(2011): Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. *Reprod Biol Endocrinol* **9**,109.

Krachudel, J., Bondzio, A., Einspanier, R., Einspanier, A., Gottschalk, J., Kuechenmeister, U., et al (2013): Lutealinsufficiency in bitches as a consequence of an autoimmune response against progesterone? *Theriogenology* **79**,1278-1283.

Kutzler, M.A., Mohammed, H.O., Lamb, S.V., Meyers-Wallen, V.N. (2003): Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology* **60**,1187-1196.

Okkens, A.C., Dieleman, S.J., Bevers, M.M., Lubberink, A.A., Willemse, A.H. (1986): Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. *J Reprod Fertil* **77(1)**,187-192.

Onclin, K., Verstegen, J.P. (1997): Secretion patterns of plasma prolactin and progesterone in pregnant compared with nonpregnant dioestrous beagle bitches. *J Reprod Fertil* **51**,203-208.

Onclin, K., Verstegen, J.P., Concannon, P.W. (2000): Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy. *J Reprod Fertil* **118**,417-424.

Papa, P.C., Hoffmann, B. (2011): The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? *Reprod Dom Anim* **46**:750-756.

Root-Kustritz, M.V. Use of supplemental progesterone in management of canine pregnancy. In: recent advances in small animal reproduction, Concannon PW, England G, Verstegen IIIJ and Linde-Forsberg C. (Eds.) International Veterinary Information Service Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) Last updated:21-apr-2001.

Rube A., Corrada, Y., Aris, D., Gobello, C. (2007): Progesterone insufficiency in bitches in early and late dioestrus. *Vet Rec***160**,524-525.

Sontas, B.H., Speroni, M., Stelletta, C., Günzel-Apel, A.R., Romagnoli, S. (2012): A systemic review and meta-analysis of serum progesterone patterns in the pregnant bitch. Proceedings of 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR), July 29-August 2, Vancouver, Canada, p.247-248.

Tibold, A., Thuróczy, J. (2009): Progesterone, oestradiol, FSH and LH concentrations in serum of progesterone-treated pregnant bitches with suspected luteal insufficiency". *Reprod Dom Anim* **44**(Suppl. 2),129-132.

Tsutsui, T. (1983): Effects of ovariectomy and treatment on the maintenance of pregnancy in bitches. *Nippon JuigakuZasshi***45**:47-51.

Uhlmann, J., Muennich, A., Gabler, C., Bondzio, A., Kuechenmeister, U., Einspanier, R. (2015): Autoimmune reaction as a cause for luteal insufficiency in bitches? Proceedings of 18th EVSSAR Congress, September 11<sup>th</sup>-12<sup>th</sup>, Hannover, Germany, p.133.

Verstegen-Onclin, K., Verstegen, J. (2008): Endocrinology of pregnancy in the dog: a review. *Theriogenology* **70**,291-299.

**Table 1.** Signalment, history, day of gestation in which pregnancy was diagnosed, resorption rate in 10 pregnant German shepherd bitches treated with 2.0 mg/kg of natural progesterone every 3<sup>rd</sup> day from day 26 post-LH onward, belonging to HT Group. (R = history of resorption; S-I = history of short interestrus interval; na = data not available)

Dog ID →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>AGE (years)</b>	7	3	3	5	4	3	3	6	5	7
<b>BW (kg)</b>	35.4	31	29.8	30	32.6	33.8	34.2	30	32.6	36.6
<b>HISTORY</b>	R	S-I	R	R	S-I	R	S-I	R	S-I	R
<b>Pregnancy Diagnosis (days from LH peak)</b>	42	33	33	29	27	30	25	na	na	31
<b>RESORPTIONS/VESICLES</b>	na	na	Na	0/4	0/3	2/7	2/8	na	na	3/6

**Table 2.** Signalment, history, day of gestation in which pregnancy was diagnosed, resorption rate in 12 pregnant different breeds, belonging to NT group (5 Flat Coated Retriever, 4 Boxer, 2 Collie, 1 Staffordshire Bull Terrier). (na = data not available)

Dog ID →	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<b>AGE (years)</b>	5	3	4	3	5	3	4	4	3	2	8	6
<b>BW (kg)</b>	30	30	30	29.5	30.5	33	31.9	16.8	25.6	21.5	28.1	32
<b>ANAMNESIS</b>												
<b>Pregnancy Diagnosis (days from LH peak)</b>	26	25	26	26	28	29	27	27	25	30	23	36
<b>RESORPTIONS/VESICLES</b>	0/8	0/3	0/4	0/6	Na	na	0/5	0/3	0/4	0/3	*3/9	*2/5

\*Cases n. 21 and 22 were excluded from the statistical analysis and described separately because of resorption sites detected by US.

**Table 3.** Serum progesterone (P4) concentrations in hypofertile treated group (HT) bitches and non treated group (NT) bitches during 9 weeks of pregnancy. P4 concentrations are expressed as mean ± SEM.

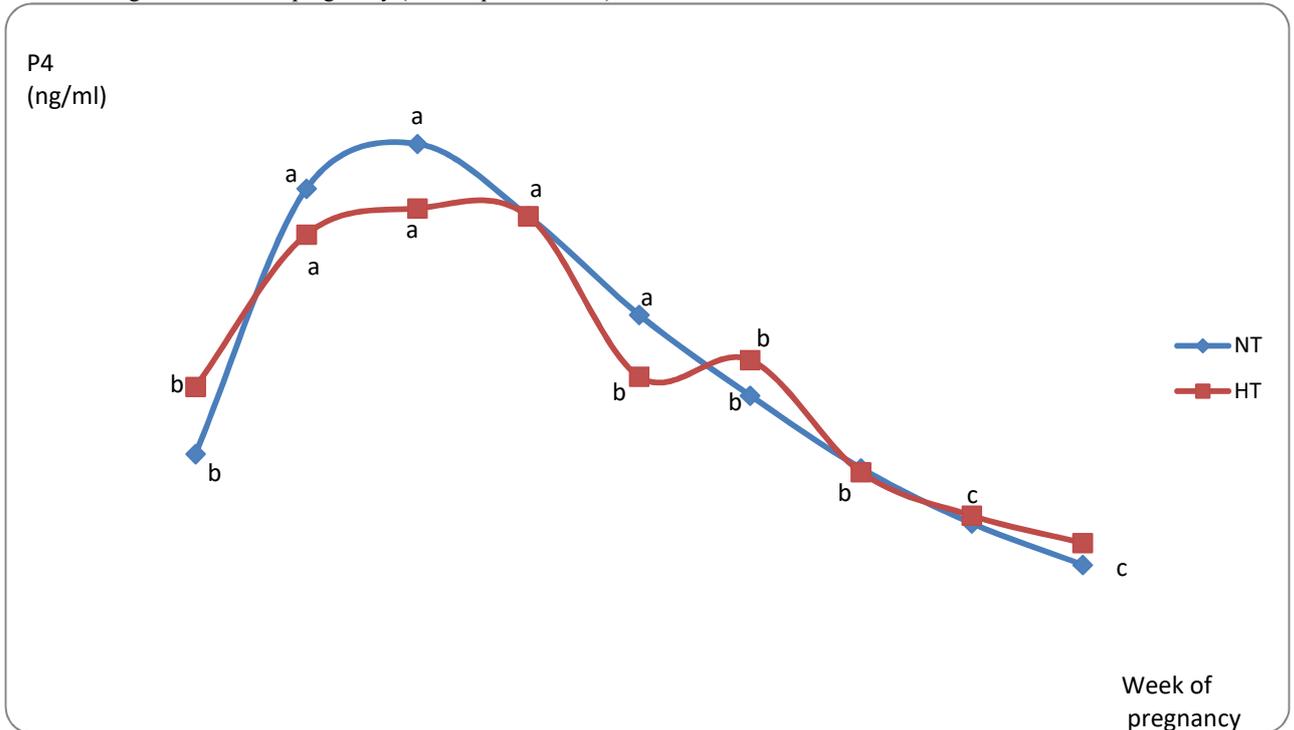
WEEK OF PREGNANCY	HT (ng/ml) (N=10)	NT (ng/ml) (N=10)
1	13.32 ± 1.26b	9,88±1,20b
2	21.11 ± 1.49a	23.46 ± 1.34a
3	22.45 ± 1.38a	25.75 ± 1.34a
4*	22.05 ± 1.38a	22.05 ± 1.34a
5	13.84 ± 1.62b	17.00 ± 1.34a
6	14.69 ± 1.43b	12.87 ± 1.30b
7	8.96 ± 1.38b	9.15 ± 1.34b
8	6.73 ± 1.43c	6.33 ± 1.23c
9	5.33 ± 1.30c	4.21 ± 1.2c

\*week in which treatment begins in HT.

Different letters in the same line means a significant difference (P<0.05).

Different letters in the same column means a significant difference (P<0.05).

**Figure 1.** Serum progesterone (P4) concentration in non treated group (NT) and hypofertile treated group (HT) bitches during the 9 weeks of pregnancy (Least squares means).



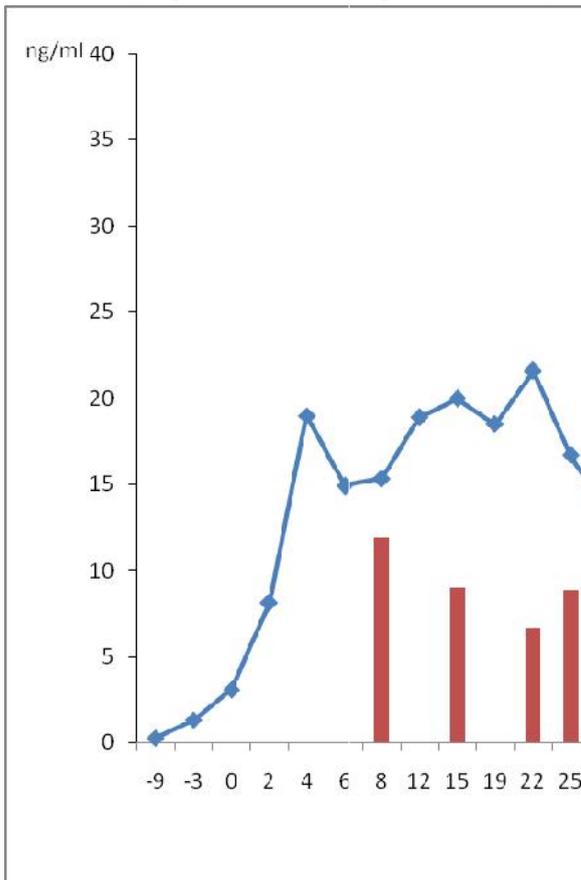
Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

**Table 4.** Serum prolactin (PRL) concentrations in hypofertile treated group (HT) bitches and non treated group (NT) bitches. PRL concentrations are expressed as median and interquartile range.

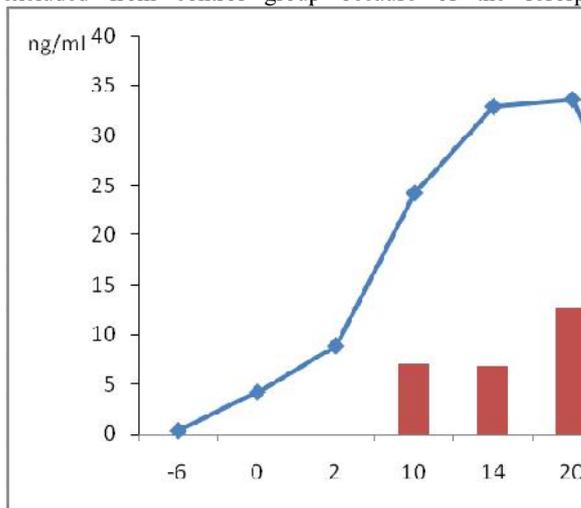
WEEK OF PREGNANCY	HT		NT		Mann-Whitney non parametric test	P
	Median (ng/ml)	Interquartile range (ng/ml)	Median (ng/ml)	Interquartile range (ng/ml)		
2	5.42c	4-9,02	44.24a	24.4-69.75	40	0.008
3	5c	5.14-7	34.4a	24.18-118.36	54.5	0.003
4	5b	6-10.85	95a	41-152	201	< 0.0001
5	8.51b	7.77-10.77	161a	86-189.02	5	0.0008
6	10b	9.51-12.65	90.72a	43.78-147	53	0.003
7	10.66b	6.97-12.46	80.27a	55.16-135.66	27	0.009
8	20.57a	16.64-28.93	84a	48.67-136.56	3	0.08
9	22.21a	18.36-38.11	80.98a	42.36-165	3	0.08
<b>Kruskal-Wallis non parametric test</b>	24.96		7.69			
<b>P</b>	0.0008		0.360			

(a) different from (b) and from (c) ( $P < 0.05$ ) in the same line and in the same column.

**Figure 2.** Serum progesterone (P4) and prolactin (PRL) concentrations in bitch n.21, one of the two bitches excluded from control group because of the resorptions detected by US at pregnancy diagnosis.



**Figure 3.** Serum progesterone (P4) and prolactin (PRL) concentrations in bitch n.22, one of the two bitches excluded from control group because of the resorptions detected by US at pregnancy diagnosis.





## **PAPER II**

### **Accuracy of Crown rump length and body diameter for the determination of gestational age in German Shepherdbreeding bitches**

Marta Cecchetto<sup>1</sup>, Juri Vencato<sup>2</sup>, Hasan Sontas<sup>2</sup>, Chiara Milani<sup>1\*</sup>, Antonio Mollo, Stefano Romagnoli<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Department of Animal Medicine Production and Health-University of Padua, via dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)-Italy

<sup>2</sup> Private practitioner, Padova, Italy

\* Corresponding author: Chiara Milani, DVM, PhD

Department of Animal Medicine Production and Health-University of Padua

via dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)-Italy

Tel. (+39) 0498272947

Fax. (+39) 0498272947

Email: [chiara.milani@unipd.it](mailto:chiara.milani@unipd.it)

## **Introduction**

In clinical practice, an accurate knowledge of the day of delivery is increasingly requested to assure an attentive monitoring of the parturition either when anamnesis or clinical conditions of the whelping bitch asks for a continuous assistance or a consultation by the veterinarian, or when it is necessary to plan a C-section, in order to increase neonatal survival and to improve the management of the entire peripartum.

The determination of the gestational age and the prediction of the day of parturition obtained by ultrasonography (US) has already been deeply investigated in the canine species, by using different approaches. A first one consists in the assessment of the day of first visualization of fetal and extrafetal structures (Cartee et al., 1984; Lopate, 2008). However this method is not useful in clinical practice due to the need of performing the US exam once a day. Another approach consists in taking into account the correlation between the measurement of many specific structures, belonging to fetus or its gestational sac, and the gestational age of fetuses (Luvoni and Beccaglia, 2006; Kim et al., 2007; Lopate, 2008). In dependence on the gestational period, the most studied parameters are Inner Chorionic Cavity (ICC), Outer Uterine Diameter (OUD) for the extrafetal structures, and Crown-Rump Length (CRL), Biparietal Diameter (BP), Body Diameter (BD), Deep Portion of Telencephalic Vesicle (DPTV), for fetal structures (Beccaglia and Luvoni, 2016). Until day 35 of pregnancy, extrafetal structures are easily visualized and measured, while during the second part of pregnancy, BD and DPTV can be easily visualized (Lopate, 2008; Beccaglia et al., 2008).

As the canine species has a wide range of body size and weight that influence the rate of growth of fetuses during pregnancy, some authors elaborated specific formulae for the inner diameter of ICC and the BP, giving a highly accurate prediction in small and medium sized bitches (Luvoni and Grioni, 2000; Son et al., 2001; Kutzler et al., 2003).

Some authors have shown the possibility to use medium-sized dogs formula for ICC and BP with giant bitches (Socha et al., 2015), while others authors found equations for ICC and BP to estimate gestational age in large and giants bitches (Alonge et al., 2016). A different approach took into account the calculation of linear regression models for specific breeds, like Beagle bitches (Yeager et al., 1992), Labrador and Golden Retriever bitches (England et al., 1990).

A recent study (Groppetti et al., 2015) was focused on ICC and BP linear regression model for estimating parturition date in German Shepherd dog, showing an higher accuracy on the estimation of the day of delivery than previously reported. Additional investigation was performed by Groppetti et al. (2015) on the effects of maternal weight, age and litter size in relation to fetal biometry and to accuracy of parturition estimation. Authors suggest that specific formula from a single breed offer excellent accuracy in parturition prediction and avoid morphological variables present in dogs of different breeds even with the same size or weight. To the author's knowledge, no data are available on the determination of the whelping date based on CRL, BD and DPTV in German shepherd breed bitches.

Other fetal measurements could be considered deeply to estimate the gestational age around day 30 of pregnancy. In clinical practice, the most frequent request for pregnancy diagnosis is around day 25-30 after mating, period in which embryo and its crown-rump length (CRL) can be clearly and easily visualized and recorded (Lopate, 2008).

During the second part of pregnancy, also body diameter (BD) and deep portion of telencephalic vesicle (DPTV) can be easily visualized (Lopate, 2008; Beccaglia et al., 2008), and many authors state that BD is well correlated with gestational age (England et al., 1990; Yeager et al., 1992; Moriyoshi et al., 1996). To the author's knowledge, no

data are available on the determination of the whelping date based on CRL, BD and DPTV in German shepherd breed bitches.

The aim of the work is a) to verify the accuracy of the prediction of the day of delivery using the linear regression models for ICC and BP previously established by Groppetti et al. (2015); b) to establish a linear regression model for fetal US measurements of CRL, BD and DPTV in German shepherd bitches, and to verify their accuracy in bitches with unknown ovulation day.

## **Materials and Methods**

### *Animals*

Twenty-two breeder-owned pregnant German Shepherd bitches, aged between 2 and 7 years and weighing between 28 and 40 kgbw, were included in the study. All bitches were presented to the reproductive unit of the Veterinary Teaching Hospital of the University of Padova during estrus for the estimation of ovulation and of the optimal breeding time and after mating during the luteal phase for the pregnancy diagnosis. All the bitches belonged to the same breeder, and written consent for all the clinical procedures was obtained.

For the optimal breeding time, a complete history was collected and clinical examination, vaginal cytology and blood sample collection for serum progesterone assay were performed in order to detect the ovulation day. The day of ovulation was established as the day in which progesterone concentration was between 4-10 ng/ml (Concannon, 2011).

The progesterone concentration was determined by using a chemiluminescence method (Immulite 1000, Medical System, Genova, Italia), previously validated in the dog (Kutzler et al., 2003). All the bitches were mated 48-72 hours after ovulation. For

16 out of 22 bitches the day of ovulation was known, while for 6 out of 20 bitches, only mating date was collected for the study.

The US pregnancy diagnosis was performed at 21<sup>st</sup>-24<sup>th</sup> days after ovulation or mating. At least two ultrasound exams were performed in all the 20 pregnant bitches throughout pregnancy based on clinical needs, using General Electric® Medical System LOGIQ P5/A5 machine (Solingen, Germany), equipped with a multifrequency convex probe (6-10 MHz). The subjects were positioned in lateral recumbency, after hair clipping in the abdominal region and application of contact gel. Bitches were considered pregnant when at least a gestational sac was visualized as an anecogenic round structure surrounded by a thick hyperecogenic wall representing the uterus, and a subtle hyperecogenic sheath, representing the placenta (England and Russo, 2006).

During all the US examination, at least two alive fetuses with a heart rate within the physiological range (180-250 bpm, Verstegen et al., 1993) were considered for measurement.

For all the bitches, the whelping date and the number of born fetuses was recorded. For the bitches with known ovulation day, only those having a pregnancy length between 61 and 64 days from the estimated day of ovulation were included in the study.

#### *Parameters taken into account*

The parameters measured in this study were: Inner Chorionic Cavity (ICC), Body Diameter (BD), Crown Rump Length (CRL), Biparietal Diameter (BD), and Deep Portion of Telencephalic Vescicle (DPTV).

Each parameter was measured during early or late pregnancy, according to literature data (Beccaglia and Luvoni, 2006; Son et al., 2001; Yeager et al., 1992; Lopate, 2008).

The study was divided into three experiments:

- Experiment 1: the aim is to verify the accuracy of ICC and BP linear regression formulae proposed by Groppetti et al. (2015) for the estimation of parturition date in pregnant German Shepherd bitches;
- Experiment 2: the aim is to calculate linear regression formulae for BD, CRL and DPTV to estimate the day of parturition in German Shepherd bitches.
- Experiment 3: the aim is to calculate the accuracy of the estimation of the day of parturition in German Shepherd bitches with unknown ovulation day using BD, CRL and DPTV linear regression formulae calculated in the experiment 2.

#### EXPERIMENT 1

Data of ICC and BP were used to estimate DBP using the formula of the linear regression elaborated by Groppetti et al. (2015) reported above:

$$\text{DBP: } 44.76 - (4.34 \times \text{ICC})$$

$$\text{DBP: } 38.65 - (12.86 \times \text{BP})$$

The estimated DBP was compared with the effective day of parturition of the bitches.

Accuracy of prediction was considered as the percentages of expected parturition occurring within  $\pm 1$  day or  $\pm 2$  days from the effective day of parturition.

The effect of the litter size ( $\leq 3$  pups; 4-8 pups;  $\geq 9$  pups) and of the interval of days of pregnancy (ICC:  $< -35$  DBP and  $\geq -35$  DBP; BP:  $< -15$  DBP and  $\geq -15$  DBP) on the accuracy of prediction of ICC and BP were also taken into account.

#### EXPERIMENT 2

A linear regression model was used for BD, CRL and DPTV in order to describe the relationship between the growth of these parameters and the estimation of the

days before parturition (DBP). Data were elaborated using SAS program (Institute Inc., Cary, NC, USA);

### EXPERIMENT 3

The equations obtained for BD, CRL and DPTV to estimate DBP were applied in 5/20 pregnant German Shepherd bitches with unknown ovulation day.

The accuracy ( $\pm 1$  day or  $\pm 2$  days) of the prediction of delivery day for each parameter was calculated.

### Results

A total of two bitches were excluded from data analysis because of missing data about parturition date and litter size for one bitch, and because of a shorter than normal pregnancy length from the estimated day of ovulation for another bitch.

For the 20 bitches included in the study, a total of 122 pups were born, with a range of litter size between 1 and 10 puppies.

A total of 76 US examinations were performed, and a total of 369 fetal biometry were collected

(ICC n=70; BD n=101; CRL n=55; BP n=86; DPTV n=57). Specifically, ICC was measured until -23 days from parturition; CRL between -38 and -19 days before delivery; BD from -33 and -9 days before parturition; BP from -31 and -2 days before delivery; DPTV was measured between -27 and -9 days before parturition.

### Experiment 1

For the experiment one, ICC estimation of DBP are presented in Table 1 and Fig.1, while BP data estimation using the formula of Groppetti et al. are presented in Table 4 and Fig. 2. The difference between effective DBP and estimated DBP for ICC ranges from 0.04 to 5.58 days, and from 0.03 to 6.81 days for BP.

Table 2 describes the accuracy of ICC considering the litter size and table 3 describes the accuracy of ICC considering the days in which measurements were collected.

Accuracy was higher in pregnancies having a litter size  $\geq 9$  pups than in pregnancies having a 4-8 pups litter size (58.33% vs 55.56%  $\pm 1$  days accuracy and 91.67% vs 88.89%,  $\pm 2$  days accuracy, respectively) and when ICC measurements were collected more than 35 days before parturition (76.92% vs 41.17%  $\pm 1$  days accuracy and 100% vs 82.53%,  $\pm 2$  days accuracy, respectively).

Table 5 and table 6 describe the accuracy of BP considering litter size and days in which measurements were collected.

Accuracy was higher when litter size is between 4 and 8 pups instead than more than nine (74.19% vs 57.14%  $\pm 1$  days accuracy and 87.10% vs 71.43%  $\pm 2$  days accuracy, respectively), and when measures were taken more than 15 days before parturition (82.60% vs 58.82 $\pm 1$  days and 95.65% vs 70.58%  $\pm 2$  days).

### Experiment 2

Linear regression of CRL, BD and DPTV measurements related to the days remaining to the parturition are shown in fig. 3-4-5 and in table 7. The coefficient of determination  $R^2$  is 0.95, 0.85 and 0.61 for CRL, BD and DPTV equations, respectively.

### Experiment 3

Table 8 describes the accuracy in the estimation of the days from parturition (DBP) when equation previously calculated for CRL, BD, and DPTV measurements were applied. The most accurate parameter was BD (71.43%  $\pm 1$  days and 100% $\pm 2$  days of accuracy respectively), followed by both CRL and DPTV.

## Discussion

The application of Groppetti et al. (2015) formula on our ICC and BP data shows that the linear regression lines have good accuracy in the estimation of date parturition. The difference between effective DBP and estimated DBP for ICC ranges from 0.04 to 5.58 days, and from 0.03 to 6.81 days for BP. This data show that the linear regression lines could have an error in the estimation of the day of parturition. The estimated length of pregnancy could be greater than the real pregnancy length, even more of 5 days (5.58 days for BP and 6.81 days for BP). Five days are a long period if we consider that canine pregnancy lasts  $63 \pm 1$  days from ovulation day, affecting the results of gestation management (C-section, assistance of parturition) that could bring to neonatal loss. The accuracy of ICC in estimating parturition day is higher when the parameter is collected more than 35 days before parturition (Figure 1; Table 3). In this period ultrasonographic pregnancy diagnosis occurs and embryo vesicles are visualized; ICC is the most reliable parameters in the estimation of parturition date in this interval of pregnancy (Yeager et al., 1992). This result is congruent with previous studies on bitches of small and medium size (Beccaglia e Luvoni, 2006), or big and giant size (Alonge et al., 2016). Accuracy was higher in pregnancies having a litter size  $\geq 9$  pups than in pregnancies having a 4-8 pups litter size with an error of  $\pm 1$  or  $\pm 2$  days (Table 2). Pregnancy with less than 3 puppies could last more than physiological gestation (Eilts et al., 2005; Mir et al., 2011). Moreover, when fetuses are less than 3, they have more uterine space to grow and fetal measurements are greater than those register in bigger litter size (Eilts et al., 2005; Mir et al., 2011).

BP is more accurated in the prediction of parturition date when measurement is taken more than -15 days before the end of pregnancy with an error of  $\pm 1$  or  $\pm 2$  days (Figure 2; Table 6). This period of gestation corresponds to the moment of radiograph exam for

puppies count and bones of the skull are well calcified and visualized (Lopate, 2008). Accuracy was higher when litter size is between 4 and 8 pups instead than more than nine with an error of  $\pm 1$  or  $\pm 2$  days (Table 5).

In the second part of the work linear regression lines for BD, CRL and DPTV for the estimation of parturition date were elaborated (Table 7, Figure 3, Figure 4, Figure 5).

BD is the most accurate parameters in the estimation of parturition date. BD is measured during the second part of gestation, when fetal abdominal structures are visualized (liver and stomach) (Lopate, 2008). This result is congruent with previous study (England et al., 1990; Kutzler et al., 2003; Son et al., 2001).

CRL is less accurate in prediction of parturition date near to the end of gestation, because of the flexion of the fetus growing in the uterus (England et al., 1990). Moreover, during the last period of pregnancy an image of whole fetal length is difficult to obtain (Luvoni e Beccaglia, 2006).

The deep portion of telencephalic vesicle (DPTV) is the parameters with less accuracy, as what happened in previous studies (Beccaglia et al., 2008; Beccaglia e Luvoni, 2004). This structure is difficult to measure when pregnancy is near to term, because of the calcification of the fetal skull (Beccaglia et al., 2008). Despite this, DPTV could be useful in the estimation of parturition date and it could be measured in the same plane of BP, without an extension of the duration of ultrasound exam.

It could be interesting to increase the number of BD, CRL and DPTV measurements, in order to improve the accuracy in the estimation of parturition date.

This is the first study focused on the elaboration of formula for BD, CRL and DPTV to estimate parturition date in German shepherd bitches.

The linear regression lines for BD, CRL and DPTV were used in pregnant German shepherd bitches with unknown ovulation day (Table 8). Results confirm the more

accuracy of BD than CRL and DPTV, with 71.43% and 100% of accuracy with an error of  $\pm 1$  or  $\pm 2$  days, respectively.

CRL and DPTV are less accurate in the prediction of parturition date (60% and 80% with an error of  $\pm 1$  or  $\pm 2$  days, respectively). This could be due to low number of measurements used in this part of work. It could be interesting to improve the accuracy of the formula for BD, CRL and DPTV in bitches with unknown ovulation day, increasing the number of these fetal measurements.

Moreover it could be interesting to investigate the accuracy of BD, CRL and DPTV equations on the basis of litter size and bitches age.

## **Bibliography**

Alonge, S., Beccaglia, M., Melandri, M., Luvoni, G.C. (2016): Prediction of whelping date in large and giant canine breeds by ultrasonography foetal biometry. *J Sma Anim Pract* 57:479-483.

Beccaglia M., Luvoni G.C. (2004): Ultrasonographic study during pregnancy of the growth of an encephalic portion in the canine foetus. *Vet Res Commun* 28, Suppl 1:161-164.

Beccaglia M., Luvoni G.C. (2006): Comparison of the accuracy of two ultrasonographic measurements in predicting the parturition date in the bitch. *J Small Anim Pract* 47(11): 670-673.

Beccaglia, M., Faustini, M., Luvoni, G.C. (2008): Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus. *Reprod Dom Anim* 43: 367-370.

Beccaglia M, Alonge S, Trovò C, Luvoni GC (2016) "Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update" *Reprod Domest Anim* 51(Suppl 1): 12-17.

Cartee, R.E., Rowles, T. (1984): Preliminary study of the ultrasonographic diagnosis of pregnancy and fetal development in the dog. *Am J Vet Res* 45: 1259-1265.

3.Concannon, P.W. (2011): Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Scien* 124:200-210.

England, G.C.W., Allen, W.E., Porter, D.J. (1990): Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age. *J Small Anim Pract* 31: 324-329.

England, G.C.W., Russo M. (2006): Ultrasonographic characteristics of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology* 66: 1694-1698.

Groppetti, D., Vegetti, F., Bronzo, V., Pecile, A. (2015): Breed-specific fetal biometry and factors affecting the prediction of whelping date in the German shepherd dog. *Anim Reprod Sci* 152: 117-122.

Kim, B., Son, C. (2007): Time of initial detection of fetal and extra-fetal structures by ultrasonographic examination in Miniature Schnauzer bitches. *Veter Sci* 8(3): 289–293.

Kutzler, M.A., Mohammed, H.O., Lamb, S.V., Meyers-Wallen, V.N. (2003): Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology* 60,1187-1196.

Kutzler, M.A., Yeager, A.E., Mohammed, H.O., Meyers-Wallen, V.N. (2003): Accuracy of canine parturition date prediction using fetal measurement obtained by ultrasonography. *Theriogenology* 60: 1309-1317.

Lopate, C. (2008): Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology*, 70: 397-402.

Luvoni, G.C., Grioni, A. (2000): Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonographic fetal measurements. *J Small Anim Pract* 41: 292-294.

Moriyoshi M, Waki Y, Nakao T, Kawata K (1996) “Observation of the growth of a beagle embryo and fetus by ultrasonography” *J Vet Med Sci* 58: 443-445.

Son, C., Jeong, K., Kim, J., Park, I., Kim, S., Lee, C. (2001): Establishment of prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs. *J Veter Med Sci* 7: 715-721.

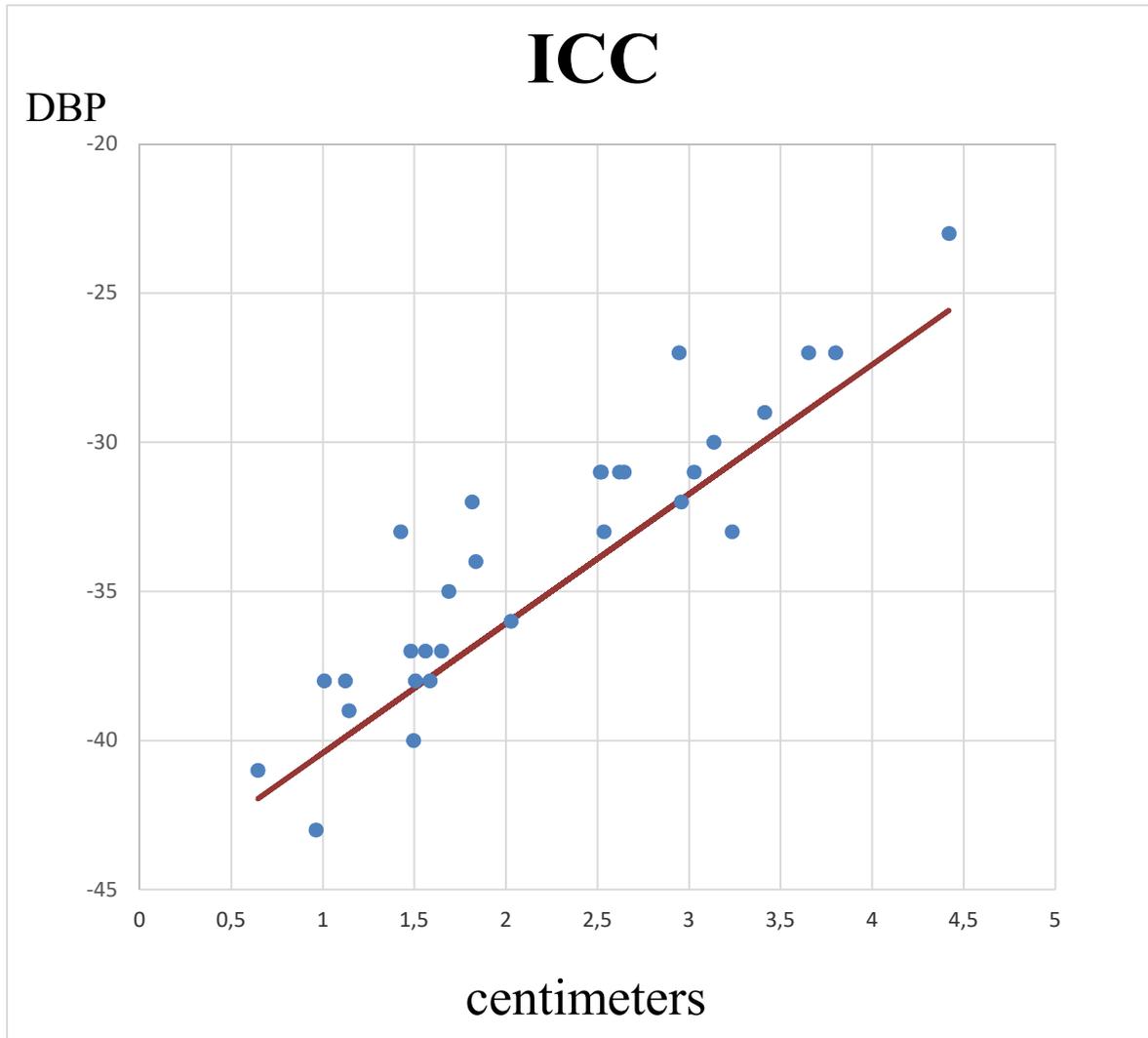
Yeager, A.E., Mohammed, H.O., Meyers-Wallen, V., Vannerson, L., Concannon, P.W. (1992): Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in Beagles. *Am J Vet Res* 3: 342-351.

Socha P, Janowski T, Bancercz-Kisiel A (2015) "Ultrasonographic fetometry formulas of inner chorionic cavity diameter and biparietal diameter for medium-sized dogs can be used in giant breeds" *Theriogenology* 84: 779-783.

Verstegen JP, Silvia LDM, Onclin K, Donnay I (1993) "Echocardiographic study of heart rate in dog and cat fetuses in utero" *J Reprod Fertil Suppl* 47: 174-180.

**Table 1.** Number of ultrasound exams (US), number of bitches, mean off ICC, effective day before parturition ( $DBP_{eff}$ ) and estimated ( $DBP_{est}$ ) and difference between these two data ( $\Delta DBP_{eff-est}$ ). ICC values are obtained from the mean of measurements taken in the two fetuses examined during each ultrasound.

US	BITCH	ICC	$DBP_{eff}$	$DBP_{est}$	$\Delta DBP_{eff-est}$
1	1	1,43	-33,00	-38,58	5,58
2	2	1,12	-38,00	-39,89	1,89
3	2	2,52	-31,00	-33,84	2,84
4	3	1,51	-38,00	-38,23	0,23
5	3	2,65	-31,00	-33,28	2,28
6	4	2,03	-36,00	-35,96	-0,04
7	4	3,65	-27,00	-28,91	1,91
8	5	0,65	-41,00	-41,96	0,96
9	5	1,84	-34,00	-36,80	2,80
10	6	2,62	-31,00	-33,39	2,39
11	7	2,54	-33,00	-33,76	0,76
12	7	3,80	-27,00	-28,27	1,27
13	8	3,41	-29,00	-29,95	0,95
14	9	0,96	-43,00	-40,58	-2,42
15	9	1,50	-40,00	-38,27	-1,73
16	9	3,24	-33,00	-30,72	-2,28
17	10	1,01	-38,00	-40,39	2,39
18	10	2,52	-31,00	-33,82	2,82
19	11	2,95	-27,00	-31,98	4,98
20	12	1,14	-39,00	-39,80	0,80
21	12	1,82	-32,00	-36,88	4,88
22	13	1,48	-37,00	-38,34	1,34
23	13	3,14	-30,00	-31,15	1,15
24	13	4,42	-23,00	-25,58	2,58
25	14	1,56	-37,00	-37,99	0,99
26	15	1,65	-37,00	-37,61	0,61
27	16	1,59	-38,00	-37,88	-0,12
28	16	3,03	-31,00	-31,62	0,62
29	17	2,96	-32,00	-31,92	-0,08
30	18	1,69	-35,00	-37,44	2,44



**Figure 1.** Application of linear regression models previously established by Groppetti et al. (2015) (red line) to our ICC data (blue points).

LITTER SIZE	N° BITCHES	N° MEASUREMENTS	± 1 DAY (%)	± 2 DAYS (%)
<= 3	0	0		
4-8	13	18	(10/18)55.56	(16/18)88.89
>= 9	5	12	(7/12)58.33	(11/12)91.67
TOT	18	30	(17/30)56.67	(27/30)90.00

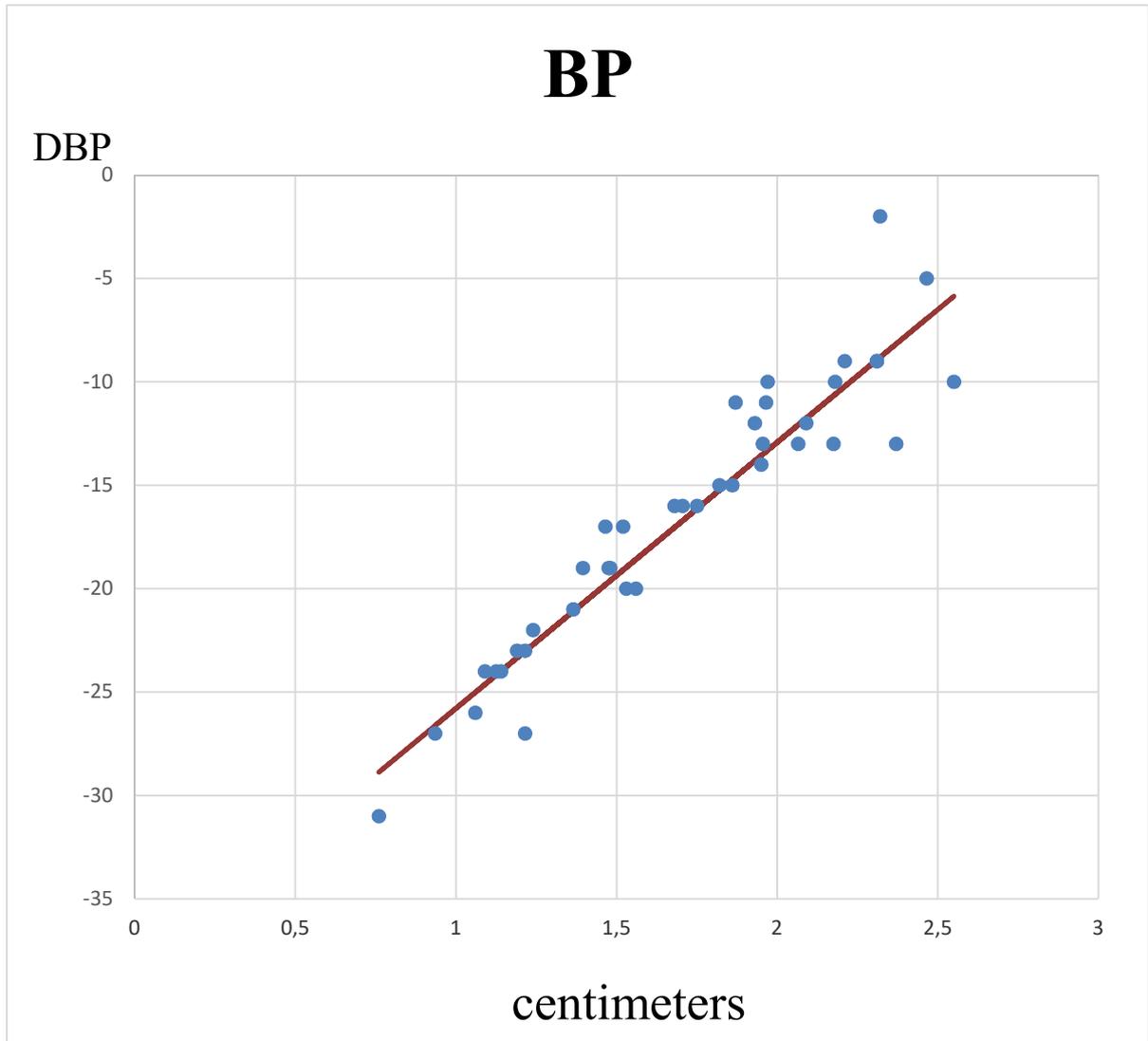
**Table 2.** Accuracy of parturition day prediction, with an error of 1 or 2 days, using ICC data. Bitches and measurements are divided on the basis of litter size. Accuracy is expressed in %.

DBP	N° MEASUREMENTS	± 1 DAY (%)	± 2 DAYS (%)
<= -35	13	(10/13)76.92	(13/13)100
> -35	17	(7/17)41.17	(14/17)82.35

**Table 3.** Accuracy of parturition day prediction, with an error of 1 or 2 days, using ICC data. ICC measurements are divided in two period, before and after 35<sup>th</sup> DBP. Accuracy is expressed in %.

**Table 4.** Number of ultrasound exams (US), number of bitches, mean off BP, effective day before parturition ( $DBP_{eff}$ ) and estimated ( $DBP_{est}$ ) and difference between these two data ( $\Delta DBP_{eff-est}$ ).

US	BITCH	BP	$DBP_{eff}$	$DBP_{est}$	Diff <sub>est-eff</sub>
1	1	1,52	-17,00	-19,10	2,10
2	2	0,76	-31,00	-28,88	-2,12
3	2	1,13	-24,00	-24,18	0,18
4	2	1,47	-17,00	-19,81	2,81
5	2	1,97	-11,00	-13,38	2,38
6	3	1,22	-27,00	-23,03	-3,97
7	3	1,24	-22,00	-22,70	0,70
8	3	1,95	-14,00	-13,57	-0,43
9	3	2,37	-13,00	-8,17	-4,83
10	4	0,94	-27,00	-26,63	-0,37
11	4	2,07	-13,00	-12,09	-0,91
12	5	1,56	-20,00	-18,59	-1,41
13	5	2,18	-13,00	-10,68	-2,32
14	6	1,19	-23,00	-23,35	0,35
15	6	1,75	-16,00	-16,15	0,15
16	6	2,31	-9,00	-8,94	-0,06
17	7	1,06	-26,00	-25,02	-0,98
18	7	2,09	-12,00	-11,77	-0,23
19	8	1,48	-19,00	-19,62	0,62
20	8	2,18	-10,00	-10,62	0,62
21	9	1,09	-24,00	-24,63	0,63
22	9	1,40	-19,00	-20,71	1,71
23	9	1,97	-10,00	-13,32	3,32
24	9	2,32	-2,00	-8,81	6,81
25	10	1,53	-20,00	-18,97	-1,03
26	10	1,93	-12,00	-13,83	1,83
27	11	1,14	-24,00	-23,99	-0,01
28	11	1,87	-11,00	-14,60	3,60
29	11	2,47	-5,00	-6,95	1,95
30	12	1,22	-23,00	-23,03	0,03
31	13	1,71	-16,00	-16,72	0,72
32	13	2,21	-9,00	-10,23	1,23
33	14	1,37	-21,00	-21,10	0,10
34	14	1,86	-15,00	-14,73	-0,27
35	15	1,82	-15,00	-15,24	0,24
36	15	2,31	-9,00	-8,94	-0,06
37	16	1,68	-16,00	-17,05	1,05
38	16	2,55	-10,00	-5,86	-4,14
39	17	1,48	-19,00	-19,68	0,68
40	17	1,96	-13,00	-13,51	0,51



**Figure 2.** Application of linear regression models previously established by Groppetti et al. (2015) (red line) to our BP data (blue points).

LITTER SIZE	N° BITCHES	N° MEASUREMENTS	± 1 DAY (%)	± 2 DAYS (%)
<= 3	1	2	(2/2)100	(2/2)100
4-8	13	31	(23/31)74.19	(27/31)87.10
>= 9	3	7	(4/7)57.14	(5/7)71.43
TOT	17	40	(29/40)72.50	(34/40)85.00

**Table 5.** Accuracy of parturition day prediction, with an error of 1 or 2 days, using BP data. Bitches and measurements are divided on the basis of litter size. Accuracy is expressed in %.

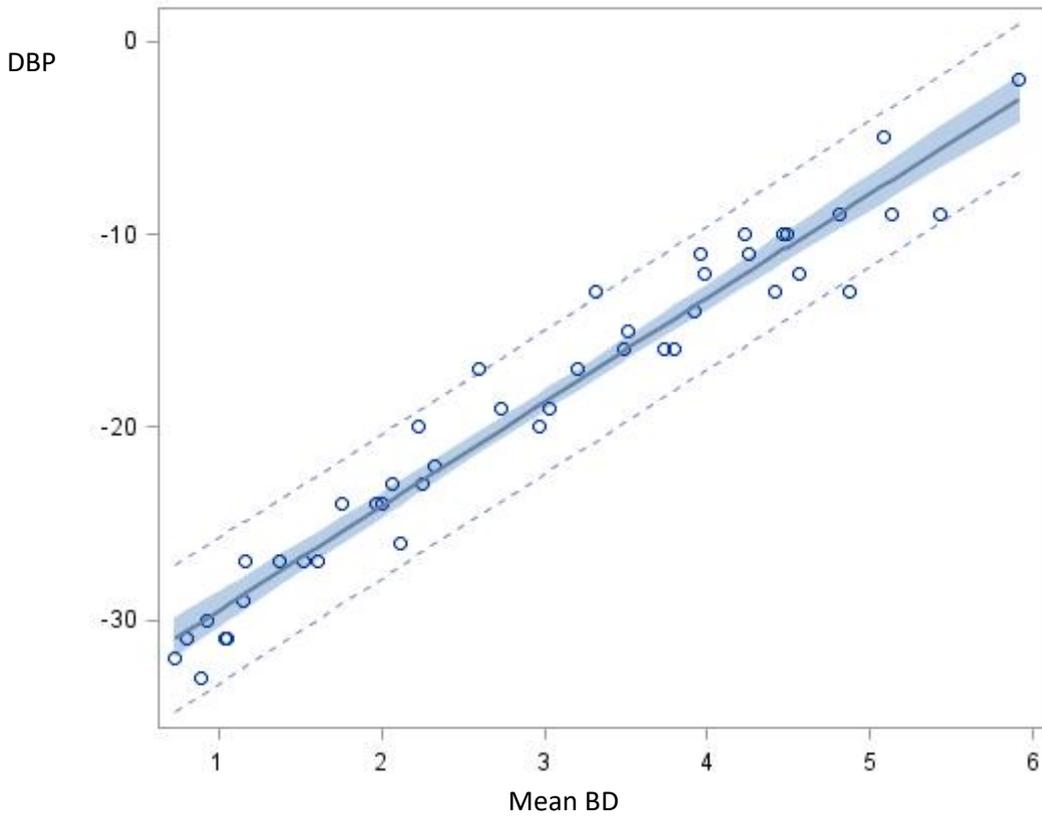
DBP	N° MEASUREMENTS	± 1 DAY (%)	± 2 DAYS (%)
<= -15	23	(19/23)82.60	(22/23)95.65
> -15	17	(10/17)58.82	(12/17)70.58

**Table 6.** Accuracy of parturition day prediction, with an error of 1 or 2 days, using BP data. BP measurements are divided in two period, before and after 35<sup>th</sup> DBP. Accuracy is expressed in %.

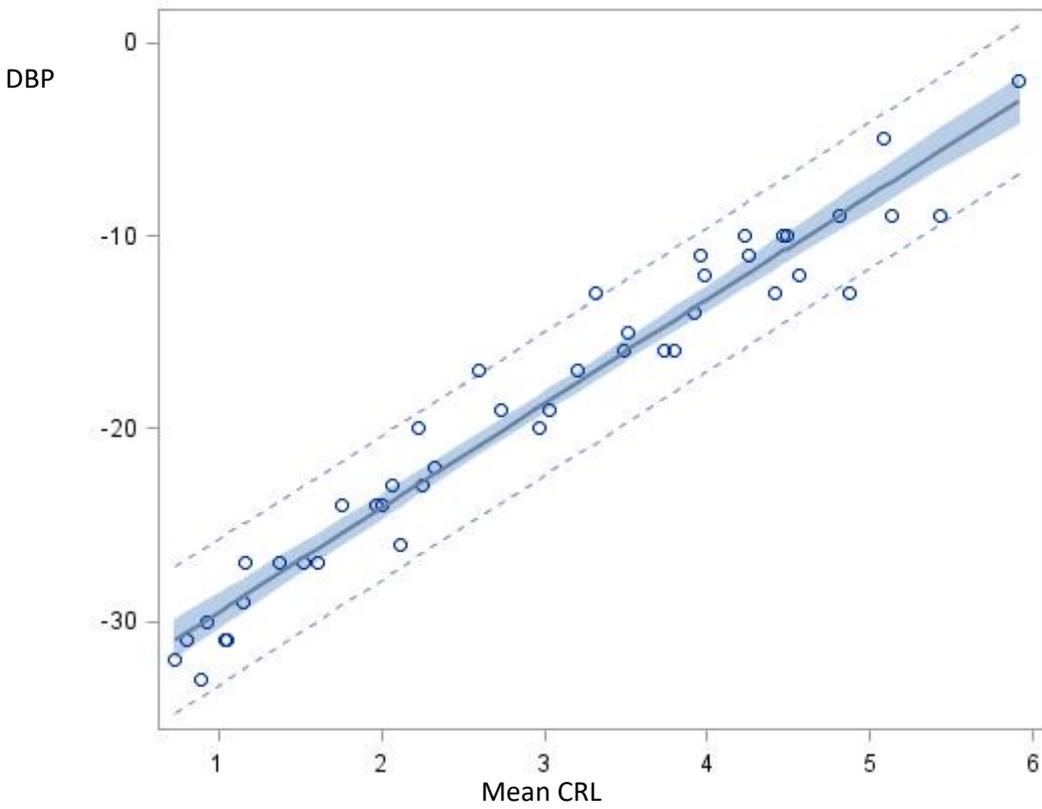
Equations	R <sup>2</sup>	P
DBP = -34.92 +(5.41*BD)	0.95	<0.001
DBP = -35.41 +(2.10*CRL)	0.85	<0.001
DBP = -33.56 +(28.38*DPTV)	0.61	<0.001

**Table 7.** Equations and coefficient of determination (R<sup>2</sup>) for ultrasonographic biometric measurements BD, CRL and DPTV.

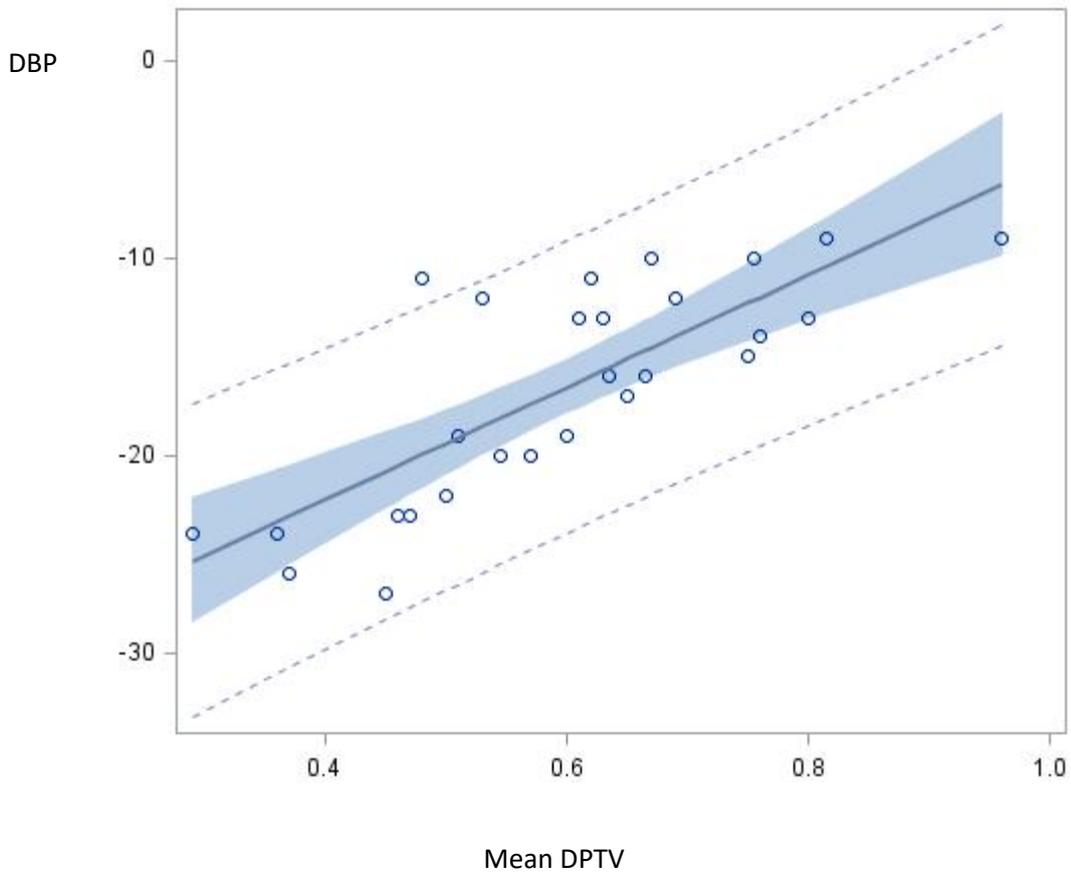
DBP: days before parturition; BD: body diameter; CRL: crown-rump length; DPTV: deep portion of telencephalic vesicle.



**Figure 3.** BD linear regression line elaborated for the estimation of parturition date.



**Figure 4.** CRL linear regression line fir the estimation of parturition date.



**Figure 5.** DPTV linear regression line for estimation of parturition date.

STRUCTURE	N° BITCHES	N° MEASUREMENTS	±1 DAY (%)	±2 DAYS (%)
BD	5	7	(5/7)71.43	(7/7)100
CRL	5	5	(3/5)60	(4/5)80
DPTV	5	5	(3/5)60	(4/5)80

**Table 8.** Accuracy of linear regression lines for estimation of parturition date using BD, CRL and DPTV measurements registered in bitches with unknown ovulation date. The accuracies are expressed in percentage, with a tolerance of  $\pm 1$  or  $\pm 2$  day.

## **PAPER III**

### **Postponement of puberty in queen treated with deslorelin**

M. Cecchetto, P. Salata (1), A. Baldan (1), C. Milani, A. Mollo, C. Fontaine (2), H. Sontas (3), D. Gelli, De Benedictis G, C. Stelletta, S. Romagnoli

Faculty of Veterinary Medicine, University of Padova, Padova, Italy

(1) Private practitioner, Padova, Italy

(2) Virbac, Carros, France

(3) Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul (currently: Tierambulanz Vorchdorf, Eggensteinstr. No:1, Vorchdorf, Austria)

Corresponding Author: Stefano Romagnoli, *DVM*, MS, PhD, Dipl  
ECAR, [stefano.romagnoli@unipd.it](mailto:stefano.romagnoli@unipd.it)+390498272948

Keywords: Feline, reproduction, puberty, postponement, deslorelin, queen

## Abstract

**Objectives** – The purpose of this study was to assess efficacy of deslorelin, a gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist marketed in Europe for the control of male dog reproduction, for the postponement of puberty in queens.

**Methods** – Nine 3-9 months old prepubertal queens were selected for this study, their general and reproductive health was checked through clinical, hematological, vaginal cytology and hormonal tests. Following treatment with a 4.7 mg deslorelin implant each cat received a monthly clinical examination and blood was collected for hormonal assay every third month. Cats were monitored for  $14.1 \pm 5.2$  (range 7-23) months.

**Results** - All cats were in good body conditions and normal health prior to treatment. Their health status remained unchanged throughout the study and no significant variation was observed with regard to serum progesterone or estradiol. Seven days post treatment one/9 queens showed signs of heat, and one other queen showed complete vaginal keratinization. No other signs of heat was subsequently observed in any other queen. Five queens were lost during the study after 7, 7, 16, 17 and 18 months of observation (during which time they did not show signs of heat). By the end of the study no sign of puberty was observed in the 4 remaining queens at 21-36 months of age.

**Conclusions and Relevance**- A 4.7 mg deslorelin implant was able to suppress the feline pituitary-gonadal axis leading to postponement of puberty for up to 21-36 months in the 4 queens which completed the study. Deslorelin can be considered as a safe method to postpone puberty in queens.

## Introduction

The control of cat reproduction is a common problem in households, which is usually approached with reproductive surgery. Surgical gonadectomy has historically been the preferred approach to control reproduction in small animals, and particularly in cats. However, over the last decades there has been an increased attention to animal welfare which has resulted in pet cat owners and particularly cat breeders being increasingly interested in the use of non-invasive, reversible ways to control reproduction in their animals, particularly in Southern European countries. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonists, such as deslorelin, are commercially available products currently marketed for non-surgical sterilization in male dogs. Their prolonged action causes pituitary down regulation and blocks gonadal activity. Deslorelin implants are increasingly being used off-label in adult cats to stop roaming, make tom cats temporarily sterile and keep queens out of heat<sup>1-9</sup>. In prepubertal male and female dogs the use of a 4.7 or 9.4 mg deslorelin implant is capable of delaying puberty of several months (8-30 weeks)<sup>10-12</sup>. A 9-month delay was obtained in experimental queens kept in a laboratory environment with a photoperiod of 14 hours of light (14L:10D)<sup>13,14</sup>. Delaying puberty might be helpful in practice as it could give a hesitant owner more time to take a decision on what approach to use to control reproduction in her/his queen. The objective of this study was to assess efficacy of the 4.7 mg deslorelin implant to postpone puberty in privately owned prepubertal queens kept in a house-type environment.

## Materials and methods

Nine domestic shorthair European prepubertal queens were used for this study with owner's consent. Queens were 3-9 months of age and 1.4-3.5 kg body weight at the beginning of the study. The nine queens were living at home with their owners (each queen belonging to a different owner) and were under continuous observation although they all had free access to an outside backyard where they could come in contact with other cats and could also roam free. General and reproductive health conditions as well as prepubertal status were assessed at the beginning of the study through a) reproductive history; b) clinical and reproductive exam which included inspection of external genitalia, vaginal cytology and palpation of mammary glands; c) urine collection by cystocentesis; d) blood collection for haematology and hormonal assay. Queens were sedated for blood and urine collection using butorfanol IM (Dolorex, Intervet) 0.3 mg/kg, medetomidine IM (Sedator, Eurovet Animal Health) 10 mcg/kg and ketamine IM (Ketavet, Parke-Davis) 3 mg/kg.

A 4.7 mg deslorelin implant (Suprelorin, Virbac) was administered in between the shoulder blades, after which queens were checked for items a) and b) as above 7 days after implantation. From day 30 post-implantation onwards monthly checks were performed (for 18 months from the treatment of the first queen) which included items (a) through (d) (including sedation for urine and blood collection). Clinical examination included a visual and palpation check of the injection site to detect side effects. Haematology was performed using Advia 120 equipment (Siemens, Milan, Italy). Urinalysis was performed using Aution Sticks 10 PA (Arkay, Shiga, Japan). Serum concentrations of estradiol (E2) and progesterone (P4) were measured using chemiluminescence (Immulite, Medical Systems, Genova, Italy) with a minimum

detectable concentration of 0.2 ng/ml for P4 and 20 pg/ml for E2. Puberty was defined as the time when persistent, long-lasting estrous behavior was initially displayed, along with the presence of a fully keratinized vaginal smear as well as with interest in and breeding attempts by tomcats. In order to avoid missing a weak or short-lived estrous period, cat owners were given a detailed explanation of feline reproductive behavior at the beginning of the study.

Queens were enrolled into the study during a 13-month period starting in January 2008 and were followed up until puberty was displayed as defined above. The study was intended to last for a total time of 18 months from the treatment of the first queen. Queens not showing puberty after that time would be followed up by monthly telephone consultations with their owners: the onset of puberty was determined by the owner reporting classical heat-related behavior (continuous calling, rolling and showing a lordotic position) being observed in their queens. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA, GLM procedure, Sigmastat 2.0), considering time as an independent variable and hormonal values, vaginal cytology and weight as dependent variables. The day of implantation was considered as day 0 and the time post-implantation was divided in five periods of 60 days (period 1 = day 1-60; period 2 = day 61-120; period 3 = days 121-180; period 4 = days 181-240; period 5 = day >240). Correlations among different parameters were checked using the Pearson's correlation index.

## Results

The total duration of the study from enrollment of the first queen to the last clinical check and blood sampling was 19 months (January 2008-July 2009) (Table n. 1). Between July 2009 and April 2010 cat owners were contacted regularly by telephone to

check time of puberty onset in the queens who had not shown puberty earlier. All cats were in good clinical conditions and normal health prior to treatment. Haematological and urinalysis parameters were available for 8/9 queens (Tables n. 2 and 3) and were normal in all tested animals. Health status of all queens remained unchanged throughout the study except for queen n° 4 who died at 27 months of age (18 months after being implanted, without having shown puberty) because of a feline leukemia virus infection. Queens n° 2 and 3 disappeared from their homes during the 7<sup>th</sup> month of the study (both at the age of 15 months, without having shown puberty) and never came back; queen n° 5 died at 19 months of age (without having shown puberty) following a car trauma, and queen n. 8 was ovariectomized (because of owner's desire) while still prepubertal at 24 months of age. In the remaining 4 queens puberty was reported by telephone consultation with the owner to have occurred between 21 and 36 months of age.

A full-fledged heat lasting approximately 8 days with normal display of estrous behaviour (continuous calling, rolling and showing a lordotic position) was observed seven days after treatment in queen n. 2. No other signs of behavioural heat were observed in any other queen for the entire duration of the study.

Data on vaginal cytology are shown in Table n°4. Post-treatment vaginal cytology were characterized by a significantly higher percentage of keratinized epithelial cells during the first 2 months when compared to the rest of the study (Figures n. 1 and 2). For instance, queen n. 2 had 100% keratinized vaginal epithelial cells at day 7 post-treatment (coincident with her heat on day 8 post-implantation, see above). Queen n. 3 had 95% keratinized vaginal epithelial cells at day 8 post-treatment. Queen n. 4 had 100% keratinized vaginal epithelial cells at day 33 post-treatment. The percentage of

keratinized vaginal epithelial cells was <5% in these 5 queens for the rest of the study and fluctuated between 0 and 25% in the remaining 4 queens throughout the entire duration of the study. Statistical analysis showed that average values of percent keratinized vaginal epithelial cells in period 1 (days 1-60) was significantly higher than periods 2 and 3 ( $p < 0.05$ ) and period 4 ( $p < 0.01$ ). Pearson correlation index showed a negative correlation between days post-treatment and % of keratinized vaginal epithelial cells.

Following treatment with deslorelin and throughout the study, hormonal values remained basal or very close to basal concentration (Table n° 4). Serum P4 was observed to fluctuate between 0.2 and 1.2 ng/ml (N=64). The majority of serum samples had values between 0.2 and 0.99 ng/ml, only in four of the 64 samples there was a value between 1.0 and 1.2 ng/ml. Serum E2 was observed to fluctuate between <20 and 120 pg/ml (N=57). The majority of serum samples had values of <20 pg/ml, 19/57 samples had values between 20.7 and 66.5 pg/ml. Values > 20 pg/ml were not found in association with either signs of behavioural heat or a keratinized vaginal smear.

Body weight increased in all queens from  $2.43 \pm 0.66$  kg (period 0) to  $3.1 \pm 0.44$  (period 2) and to  $3.4 \pm 0.43$  kg (period 5) (Table n. 4). There was a positive correlation between body weight and time (Pearson index 0.542). Cat n°4 showed a regular increase in body weight until day 244 post-treatment, after which her body weight started to decrease, presumably due to the FeLV infection which was responsible for the cat's death on day 499 post-treatment.

In the 4 queens which were followed up for a prolonged period of time puberty was confirmed by the owner as occurring at the ages of 36 (queen n° 1), 24 (queen n° 6), 25 (queen n° 7) and 21 months (queens n° 9) (Table n. 1). Queen n° 8 was spayed at 24 months of age while still prepubertal.

There were no side effect at the injection site in any of the 9 treated queens.

## Discussion

A 4.7 mg deslorelin implant allowed the queens of our study to remain prepubertal until the age of  $22.5 \pm 6$  months. Considering the different times at which some of our patients were lost during the study, puberty was delayed at least until the age of 15 months in all 9 queens, at least 19 months in 7/9 queen, at least 21 months in 6/9 queens, at least 24 months in 4/9 queens and 25-36 months in the last 3 queens. This is a significantly longer period when considering that the reported average age at puberty for domestic cats is 4-12 months<sup>15,16</sup>.

The interval between treatment and onset of puberty observed in our cats was longer than what previously reported following treatment with a 4.7 mg deslorelin implant<sup>13</sup>. Risso et al<sup>13</sup> treated 100-day old queens with a 4.7 mg deslorelin implant and observed puberty between the age of 6 and 14 months in 28/30 cats. The reason for a longer interval treatment-puberty in our cats is difficult to explain. Environment and latitude could play a role in this difference. Risso et al<sup>13</sup> had a very homogenous population of cats maintained in a laboratory environment with a strictly followed 14L:10D photoperiod. In our case the various cat breeds and the different environmental conditions may have played a role. A natural photoperiod may be

particularly relevant when causing a reversible block of cyclicity in seasonal species: if the treatment effect ceases at a time when the season exerts a negative feedback on the hypothalamic-pituitary axis (HPA) heat or puberty may be further delayed until when the photoperiod stimulates the HPA again. Our study was conducted at a latitude of 45.24 N, while the study of Risso et al<sup>13</sup> was conducted at a latitude of 34.5 S. Proximity to the Equator influences photoperiod and may stimulate resumption of cyclicity. Sample size can also influence outcome, as we ended up with 5 queens while the results of Risso et al are based on 28 queens which completed the study<sup>13</sup>. However, our results highlight the fact that the postponement of puberty in queens treated with a 4.7 mg deslorelin implant may occur well beyond 15 and as late as 21-36 months of age.

In 3/9 queens (n° 2, 3 and 4) fully keratinized vaginal smears were found during the first month post-treatment. These queens, as well as all other queens of our study, were initially considered as prepubertal based on history, clinical and reproductive exam as well as hormonal assay. These 3 queens were treated at the age of 8, 8 and 9 months respectively, all in January. At such an age and considering their weights (2.7, 2.3 and 3.5 kg, respectively) and the photoperiod it is possible that they were very close to their first estrus. Therefore, it is likely that the deslorelin implant may have caused puberty in queen n. 2. The other 2 queens (n. 3 and 4) showed only a high degree of keratinization of the vaginal epithelium without any other behavioral signs indicative of puberty. This is probably due to GnRH causing minor LH pulses which are capable of causing follicular growth (with secretion of estradiol and vaginal epithelial keratinization) but not ovulation. Such minor LH pulses are frequently observed in females towards the end of anestrus, and bitches are known to experience late anestrus increases in estradiol

concentrations which are associated with vaginal keratinization but not vulvar swelling or serosanguineous vulvar discharge<sup>17</sup>. Therefore, it is possible that what queens n. 3 and 4 of our study experienced following treatment may actually have been not puberty but only a minor LH pulse eliciting vaginal keratinization, while pubertal heat instead might have occurred once the effect of deslorelin vanished. This is an aspect which deserves further studies. Although puberty in domestic cats can occur as late as 12 months<sup>15,16</sup>, when considering the administration of deslorelin to a queen to prevent puberty this should ideally be done well before 8 months of age.

Deslorelin treatment did not affect general health conditions. All queens were in good health prior to treatment onset and all but one queen remained healthy during the study: queen n°4 died at 27 months of age due to feline leukemia. All the queens in our study had free access to a backyard from where they could come in contact with other cats. Since none of our study cats were tested for FeLV prior to and during the study and none of them was vaccinated against this virus, it is not possible to time infection in queen n. 4.

Fertility after treatment was not checked in this study. This is an area which deserves further investigation as owners who require a reversible sterilization for their cats are certainly interested in being reassured about the fertility potential of their animals to be maintained. Body weight, on average, increased during the study. The increase in body weight is probably due to the animals being still in a growing phase of their lives. Although our result highlight the fact that deslorelin does not block body growth in prepubertal animals, this information cannot be interpreted due to the lack of a control group treated with a sham implant.

## Conclusion

Deslorelin can be considered as a safe method to postpone puberty in queens, devoid of side effects and effective up to 21-36 months of age provided that it is administered well before 8 months of age and ideally around 3-5 months of age in order to avoid inducing puberty. Although the rate of growth could not be compared to that of a control group, body growth was not prevented by the deslorelin treatment. Further studies are necessary to better understand the duration of effect as well as post-treatment fertility following the use of deslorelin in prepubertal cats.

1. Munson L, Bauman JE, Asa CS, et al. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57: 269–73.
2. Romagnoli S, Geretto N, Stelletta C, et al. Prolonged Suppression of Reproductive Activity in Male Cats with a 4.7 Mg Implant of Deslorelin. *4th International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population control*.
3. Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, et al. Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin, regarding suppression of reproductive function in tomcats. *Theriogenology* 2011; 75: 803–10.
4. Ponglowhapan S. Clinical Applications of GnRH Agonist Deslorelin in Dogs and Cats. *Thai J Vet Med* 2011; 41: 59–63.
5. Ackermann C, Trevisol E, Destro F. Deslorelin acetate (Suprelorin®) effects in semen quality of domestic cats. *Proceedings of the 7th International Symposium*

- on *Canine and Feline Reproduction* 2012; Whistler, BC, Canada; 2012 July 26–29; pp 3–4.
6. Ackermann CL, Volpato R, Destro FC, et al. Ovarian activity reversibility after the use of deslorelin acetate as a short-term contraceptive in domestic queens. *Theriogenology* 2012; 78: 817–822.
  7. Toydemir TSF, Kılıçarslan MR, Olgaç V. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. *Theriogenology* 2012; 77: 662–74.
  8. Novotny R, Cizek P, Vitasek R, et al. Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant. *Theriogenology* 2012; 78: 848–857.
  9. Romagnoli S, Baldan A, Righetti C, et al. Semen quality and interval to sterility in tom cats treated with a 9.4 mg deslorelin implant. *J Feline Med Surg* 2016; 1098612X15623985-.
  10. Kaya D, Schäfer-Somi S, Kurt B, et al. Clinical use of deslorelin implants for the long-term contraception in prepubertal bitches: effects on epiphyseal closure, body development, and time to puberty. *Theriogenology* 2015; 83: 1147–53.
  11. Fontaine E, Maenhoudt C, Mir F, et al. Postponement of puberty using GnRH agonists implants in bitches of different breeds. In: 7th International Symposium, on, *Canine and Feline Reproduction* (eds) *7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Whistler, Canada, 2012.
  12. Sirivaidyapong S, Mehl N, Trigg T. Delay of Puberty and Reproductive Performance in Male Dogs Following the Implantation of 4.7 and 9.4 mg GnRH-

- Agonist Deslorelin at an Early Pre-pubertal Age. *Reprod Domest Anim* 2012; 47: 400–402.
13. Risso a., Corrada Y, Barbeito C, et al. Long-Term-Release GnRH Agonists Postpone Puberty in Domestic Cats. *Reprod Domest Anim* 2012; 47: 936–938.
  14. Carranza A, Faya M, Merlo ML, et al. Theriogenology Effect of GnRH analogs in postnatal domestic cats. *Theriogenology* 2014; 82: 138–143.
  15. Jemmett JE, Evans JM. A survey of sexual behaviour and reproduction of female cats. *J Small Anim Pract* 1977; 18: 31–7.
  16. Povey RC. Reproduction in the pedigree female cat. A survey of breeders. *Can Vet journal La Rev vétérinaire Can* 1978; 19: 207–13.
  17. Olson PN, Bowen RA, Behrendt MD, et al. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod* 1982; 27: 1196–206.

ID	Age at study onset	Date at treatment onset	Duration of study: months of sampling (+ owner observation)	Still prepubertal at age (months)
1	8	Jan 2008	18 (+10) = 28	36
2	8	Jan 2008	7	15 <sup>a</sup>
3	8	Jan 2008	7	15 <sup>a</sup>
4	9	Jan 2008	18	27 <sup>b</sup>
5	3	Jul 2008	11 (+5) = 16	19 <sup>c</sup>
6	3	Jul 2008	11 (+10) = 21	24
7	7	Oct 2008	8 (+10) = 18	25
8	7	Oct 2008	8 (+6) = 14	24 <sup>d</sup>
9	5	Jan 2009	6 (+10) = 16	21

Table n°1 – Identification, breed, age at study onset, and total duration of observation (months from study onset) in 9 queens administered a 4.7 mg deslorelin implant (Suprelorin, Virbac) prior to onset of puberty.

(a) lost to follow up; (b) died from a feline leukemia virus infection; (c) died following a car trauma; (d) ovariectomized following owner's request.

ID	WBC K/mcl	RBC M/mcl	Hb g/dl	PVC %	PLT k/mcl
1	11.78	8.38	11.7	37.1	172
2	15.5	6.95	10.4	31.8	536
3	9.92	6.78	10.1	31.2	252
4	5.78	6.4	9.4	29.5	451
5	4.91	6.77	9.7	28.6	122
6	7.2	6.44	9.6	28.7	449
7	13.74	7.35	9.8	31.9	633
8	13.85	7.48	10.2	32.7	536
<b>Range</b>	5.0-19.0	5.0-10	10.0-15	30-45	156-800

Table n°2 – Haematological values in 8 prepubertal queens prior to treatment with a subcutaneous 4.7 mg deslorelin implant (Suprelorin, Virbac).

ID	Urine specific gravity	pH	Proteins	Keton bodies	Bilirubin	RBC
1	1032	7	+	-	-	-
2	1035	7.5	+	-	-	-
3	1005	8	+	-	-	-
4	1061	7	+	-	-	+
5	1065	6	-	-	-	-
6	1065	6	+	-	-	+
7	1045	6	+	-	-	+
8	1027	7	+	-	-	+

Table n°3 – Urinary specific weight, pH, proteins, keton bodies, bilirubin and red blood cells of 8 prepubertal queens prior to treatment with a subcutaneous 4.7 mg deslorelin implant (Siprelorin, Virbac)

Time	ID	Date	Days PT	Weight (kg)	P4	E2	% Keratinized Cells
0	1	17/01/2008	0	2.7	0.3	20	47
	2	17/01/2008	0	2.7	0.88	20	0
	3	17/01/2008	0	2.3	0.85	120	0
	4	24/01/2008	0	3.5	0.4	20	15
	5	29/07/2008	0	1.4	0.88	20	5
	6	29/07/2008	0	1.5	0.54	20	7
	7	29/10/2008	0	2.7	0.33	20	0
	8	29/10/2008	0	2.8	0.42	20	0
	9	11/02/2009	0	2.3	0.59	37	0
1	1	25/01/2008	8				3
	2	25/01/2008	8				100
	3	25/01/2008	8				95
	4	26/02/2008	33	3.15	0.91		100
	7	03/12/2008	35	3.2	0.62	20	0
	8	03/12/2008	35	3.2	0.84	20	0
	1	22/02/2008	36	3	0.2	20	0
	2	22/02/2008	36	2.8	0.72	20	0
	3	22/02/2008	36	2.4	0.87	20	0
9	19/03/2009	36	2.45	0.69	53.9	0	
2	4	02/04/2008	69	3.4	0.52		10
	9	24/04/2009	72	2.6	0.65	25.3	0
	1	02/04/2008	76	2.9	0.2	20	25
	2	02/04/2008	76	2.95	0.74		0
	3	02/04/2008	76	2.65	0.54		0
	7	11/02/2009	105	3.75	0.39	31.8	0
	8	11/02/2009	105	3.75	0.38	20	20
	4	16/05/2008	113	3.5	0.67	30.5	0
	1	16/05/2008	120	3.15	0.48	20	10
	2	16/05/2008	120	2.85	0.82	20	0
	3	16/05/2008	120	2.6	0.69	20	0
	9	15/06/2009	124	2.9	0.79	38.5	0
3	5	09/12/2008	133	3.3	0.62	20	0
	6	09/12/2008	133	3.1	0.91	20.4	0
	7	19/03/2009	141	3.95	0.93	20	0
	8	19/03/2009	141	3.85	0.79	20	0
	4	26/06/2008	154	3.45	0.66	27.7	0
	1	26/06/2008	161	3.1	0.24	20	0
	2	26/06/2008	161	2.8	0.99	20	0
	3	26/06/2008	161	2.8	0.85		0
	9	29/07/2009	168	3.05	0.55		0
	7	24/04/2009	177	3.85	0.59	25.3	0
	8	24/04/2009	177	3.7	0.77	25.3	0
	4	29/07/2008	187	3.7	0.8	20	4
4	1	29/07/2008	194	3.2	0.58	20	0
	2	29/07/2008	194	2.8	0.83	20	0
	3	29/07/2008	194	2.6	1	20	0
	5	24/02/2009	210	3.1	0.83	20	0
	6	24/02/2009	210	2.95	0.69	49.5	0
	7	15/06/2009	229	3.8	0.85	22.9	0
	8	15/06/2009	229	3.7	0.87	22.9	0
	5	4	24/09/2008	244	3.7	0.3	22
1		24/09/2008	251	3.2	0.2	20	0
7		29/07/2009	273	3.45	0.76	44.1	0
8		29/07/2009	273	3.95	1.1	44.1	0
4		29/10/2008	279	3.4	0.32		0
1		29/10/2008	286	3.95	0.26	20	0
5		04/06/2009	310	3.25	0.66	24.4	0
6		04/06/2009	310	3.05	1.1	45.6	0
4		22/12/2008	333	3.55	0.42	24.6	0
1		22/12/2008	340	3.85	0.34	20	0
4		11/02/2009	384	3.3	0.3	20	3
1		11/02/2009	391	3.7	0.48	20	0
4		24/04/2009	456	2.45	0.76	20	0
1		24/04/2009	463	3.7	0.56	20	0
4		15/06/2009	508	2.55	0.98	66.5	0
1		15/06/2009	515	3.7	0.62	20	0
1		29/07/2009	559	3.7	0.52	20	0

Table n°4 – Body weight, Keratinized cells, concentration of serum progesterone and estradiol in 9 prepuberal queens treated with a subcutaneous 4.7 mg deslorelin implant (Suprelorin, Virbac). Time 0: day of treatment; Time 1: 1-60 days post treatment; Time 2: 61-120 days post treatment; Time 3: 121-180 days post treatment; Time 4: 181-240 days post treatment; Time 5: >240 days post treatment.